

DÁRIO DE JESUS BRUM BETTENCOURT

TUBERCULOSE EM CAPRINOS:

**Estudo de um foco de tuberculose em caprinos em
Montemor-o-Novo**

Orientados: Prof. Doutor Carlos Bettencourt

Co-Orientadora: Mestre Maria do Carmo Feliciano

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

DÁRIO DE JESUS BRUM BETTENCOURT

**TUBERCULOSE EM CAPRINOS:
Estudo de um foco de tuberculose em caprinos em
Montemor-o-Novo**

**Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre
em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado
em Medicina Veterinária conferido pela Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

Orientador: Prof. Doutor Carlos Bettencourt
Co-Orientadora: Mestre Maria do Carmo Feliciano

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa
2013

Aos meus pais e avós...

Agradecimentos

Em primeiro lugar e como não podia deixar de ser, agradeço aos meus pais, por todo o apoio emocional e financeiro que me disponibilizaram para que este desejo se concretizasse e acima de tudo por me terem apoiado e aconselhado em todas as fases da minha vida.

Às minhas avós, em especial à avó Maria Alice pelo carinho, preocupação e dedicação que sempre demonstrou para comigo.

À minha namorada por todos os conselhos, companhia e por me entender sempre.

Ao primo Manuel Riqueza, que já não de encontra presente, mas que sempre se interessou pelo meu percurso académico.

Um agradecimento especial a toda a equipa da Vet +, ao Dr. Jaime Ribeiro, Dr. Evaristo Silva, Dr. Manuel Malta, Luís, Carlos, Carla e Ana, o meu muito obrigado por tudo o que me ensinaram, pelo companheirismo e sobretudo por me terem feito sentir em casa durante os 7 meses de estágio.

Aos meus colegas de curso, em particular à Ana Cláudia, Cláudia Pereira, Diogo Campos, Inácio Lourinha, Luís Silva, Manuel Moura e Nuno Freire, pela amizade, partilha de experiências e pelos bons momentos passados.

Ao Luís, ao Nuno, ao Pedro e ao Ricardo que partilharam comigo o percurso académico.

Ao meu orientador, o professor Carlos Bettencourt, e à minha co-orientadora, a professora Maria do Carmo Feliciano, o meu muito obrigado.

Ao LNIV, à Dr. Madalena Monteiro e Dra. Teresa Albuquerque, por todas as informações partilhadas e tempo disponibilizado.

Ao Dr. Mauro Bragança por toda a disponibilidade para o tratamento de dados estatísticos.

A toda a minha família e amigos.

Resumo

A tuberculose trata-se de uma doença infecto-contagiosa causada por bactérias pertencentes ao género *mycobacterium*, altamente resistentes no meio ambiente e com grande poder de disseminação, podendo infetar todos os mamíferos domésticos, silváticos e o Homem, constituindo uma importante zoonose com riscos para a saúde pública e formando um entrave à livre circulação de animais no território da União Europeia.

Esta dissertação encontra-se dividida em duas partes, uma primeira parte que compreende a revisão bibliográfica onde é feita uma abordagem inicial à tuberculose em geral com apresentação das micobactérias pertencentes ao complexo *Micobacterium tuberculosis* (MTBC) responsáveis pela infeção, passando posteriormente a especificar a tuberculose para a espécie caprina, com descrição epidemiológica da doença nesta espécie, evolução das lesões e descrição das mesmas, meios de diagnóstico possíveis e seu contributo para o desenvolvimento e controlo dos focos, e a importância desta zoonose para a saúde pública. Na segunda parte, é feita toda a descrição e discussão de um foco de tuberculose caprina com aplicação prática dos conceitos assimilados na revisão da literatura.

Palavras – Chave: Caprinos, Tuberculose, Diagnóstico, *Mycobacterium caprae*.

Abstract

The tuberculosis is an infectious-contagious disease caused by bacteria from the mycobacterium type, which is highly resistant in the environment and has a great spreading power. It can infect domestic mammals, wildlife and the human being, constituting an important zoonotic disease with risks for the public health and creating an obstacle to the free animal circulation within European Union.

The first part of the thesis aggregates the bibliographic review where a first approach to the tuberculosis in general is made. Beginning with the presentation of the mycobacteria's that belong to the mycobacterium tuberculosis complex (MTBC), responsible for the infection, and thenceforward to specify the tuberculosis in goats with the epidemiological description of the disease in this specie, the evolution and the description of the lesions, the possible diagnosis means and their contribute for the development and control of the case, and the importance of this zoonotic disease for the public health. The second and last part consists in the description and discussion of the goat tuberculosis case with practical application of the concepts assimilated in the bibliographic review.

Keywords: Goats, Tuberculosis, Diagnostic, *Mycobacterium caprae*.

Abreviaturas

% - Percentagem

° C – Grau Celcius

ml – Mililitro

mm – Milímetro

cm - Centrimetros

um – Micrómetro

ADN – Ácido desoxirribonucleico

BAAR – Bacilo Ácido-Álcool Resistente

BCG – Bacilo Calmette-Guerin

DTH – Hipersensibilidade tipo IV ou retardada

DR – Repetições Diretas

DGV – Direção Geral de Veterinária

EFSA – European Food Safety Authority

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

HE – Hematoxilina-eosina

HIV – Human Immunodeficiency Vírus

IDTB – Prova de Intradermotuberculinização

IFN- γ - Gama Interferão

Ig – Imunoglobulina

IL - Interleucina

LNIV/INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

M. - *Mycobacterium*

MTBC - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

PPD – *Purified Protein Derivative*

REA – Restriction Endonuclease Analysis

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

rRNA – Ácido Ribonucleico ribossomal

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TCH – Ácido tiofeno-2-carboxílico hidrazida

UE – União Europeia

UI – Unidades Internacionais

VNTR - Variable Number Tandem Repeat

ZN – Ziehl-Neelsen

Índice Geral

I. INTRODUÇÃO.....	14
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1. Tuberculose	16
1.1. Género <i>Mycobacterium</i>	16
1.2. Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC)	17
2. Tuberculose Caprina	20
2.1. Epidemiologia.....	21
2.2. Patogenia e resposta imunitária.....	23
2.3. Vias de infeção e transmissão.....	27
2.4. Sinais Clínicos e lesões.....	29
2.5. Lesões Macroscópicas.....	30
2.6. Lesões Microscópicas.....	32
2.7. Diagnóstico	34
2.7.1. Diagnóstico in vivo.....	34
2.7.1.1. Prova Intradermotuberculinização (IDTB)	34
2.7.1.2. Detecção de Gama-interferão (IFN- γ).....	37
2.7.2. Diagnóstico post mortem	38
2.7.2.1. Diagnóstico histopatológico.....	38
2.7.2.2. Diagnóstico bacteriológico.....	39
2.7.2.3. Diagnóstico Molecular.....	41
2.8. Controlo	43
2.9. Importância para a Saúde Pública e impacto económico	45
III. ESTUDO DE UM SURTO DE TUBERCULOSE CAPRINA.....	48
1. Objetivos.....	48
2. Material e Métodos	48

2.1. Caracterização da Exploração	48
2.2. Caracterização da Amostra.....	50
2.3. Exame Clínico	50
2.4. Provas realizadas para a confirmação do diagnóstico.....	51
2.5. Prova da Intradermotuberculinização Simples	52
2.6. Exame <i>post mortem</i>	53
2.7. Diagnóstico Histopatológico	54
2.8. Diagnóstico Bacteriológico	54
3. Resultados	56
3.1. Mortalidade	56
3.2. Prova de Intradermotuberculinização	56
3.3. Exame <i>post mortem</i>	58
3.4. Diagnóstico Histopatológico	62
3.5. Diagnóstico Bacteriológico	64
3.6. Sensibilidade e Especificidade da prova de IDTB	65
4. Discussão	66
4.1. Resultados obtidos na prova de intradermotuberculinização simples.....	66
4.2. Lesões macroscópicas observadas	69
4.3. Lesões microscópicas observadas e diagnóstico bacteriológico.....	70
4.4. Fatores de Risco da exploração em estudo.....	71
4.5. Limitações deste estudo.....	73
IV. Conclusões	74
V. Considerações finais	75
1. Aspetos que podem ser melhorados no controlo e erradicação da tuberculose	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Situação da Tuberculose Bovina na UE.....	23
Tabela 2 - Doenças que desenvolvem Reação de Hipersensibilidade do tipo IV (DTH).....	25
Tabela 3 - Comparação entre lesões granulomatosas e lesões cavitárias.....	26
Tabela 4 - Descrição dos mecanismos de hipersensibilidade tipo I, II, III e IV.....	27
Tabela 5 - Tipos de lesões macroscópicas observadas na tuberculose caprina.....	31
Tabela 6 - Tipos de lesões microscópicas observadas na tuberculose caprina.....	33
Tabela 7 - Descrição das amostras enviadas para laboratório antes da IDTB simples.....	52
Tabela 8 - Evolução do número de animais no efetivo entre setembro e dezembro.....	56
Tabela 9 - Descrição das lesões microscópicas de tuberculose observadas nas amostras de 6 animais.....	62
Tabela 10 - Dados auxiliares para estudo da sensibilidade e especificidade.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Formação do granuloma tuberculoso ou tubérculo.....	24
Figura 2 - Medição da prega de pele com o uso do cutímetro.....	35
Figura 3 - Inoculação intradérmica de PPD bovina num caprino.....	35
Figura 4 - Perfil de espaçadores dos membros do MTBC obtido por Spoligotype.....	43
Figura 5 - Ordenha da exploração em estudo.....	49
Figura 6 - Pavilhão da exploração dividido por parques.....	49
Figura 7 - Animal com baixa condição corporal, apatia e mau estado geral.....	51
Figura 8 - Animal <i>post mortem</i> com magreza acentuada.....	51
Figura 9 – Reação e espessamento da prega de pele de um caprino no dia da leitura.....	57
Figura 10 – Presença de escara no local de injeção no dia da leitura da IDTB.....	57
Figura 11 – Resultados da prova de IDTB nos caprinos da raça Murciano-granadina.....	57
Figura 12 – Resultados da prova de IDTB nos caprinos da raça Florida.....	57
Figura 13 – Percentagem de animais da raça Murciano-granadina que desenvolveram lesões visíveis compatíveis com tuberculose.....	58
Figura 14 – Percentagem de animais da raça Florida que desenvolveram lesões visíveis compatíveis com tuberculose.....	58
Figura 15 – Distribuição das lesões macroscópicas observadas à necropsia.....	59
Figura 16 – Lesões anatomo-patológicas: Múltiplos granulomas individualizados no parênquima pulmonar.....	60
Figura 17 – Lesão anatomo-patológica: Granuloma tuberculoso presente no pulmão.....	60
Figura 18 – Lesão anatomo-patológica: Lesão exuberante no pulmão de um caprino.....	60
Figura 19 – Lesão anatomo-patológica: Necrose caseo-calcária ao corte de um granuloma tuberculoso.....	60
Figura 20 – Lesão anatomo-patológica: Lesão cavitária no pulmão de um caprino.....	61

Figura 21 – Lesão anatomo-patológica: Granuloma tuberculoso num gânglio linfático mediastínico.....	61
Figura 22 – Lesões anatomo-patológicas: Múltiplos granulomas de tuberculose nos gânglios linfáticos mediastínicos.....	61
Figura 23 – Lesões anatomo-patológicas: Focos de tuberculose miliar no fígado.....	61
Figura 24 – Corte histológico de Gânglio linfático: Granuloma com necrose e calcificação central; na periferia visualizam-se algumas células gigantes de Langhans.....	63
Figura 25 – Corte histológico de Gânglio linfático: Extensas zonas de necrose de caseificação e focos de mineralização.....	63
Figura 26 – Corte histológico de Pulmão: Granuloma com necrose central envolvido por macrófagos, alguns multinucleados.....	63
Figura 27 – Corte histológico de Pulmão: Periferia do granuloma com células gigantes e numerosos linfócitos.....	63
Figura 28 – Corte histológico de Pulmão: Foco de necrose com formação de caverna.....	64
Figura 29 – Corte histológico de Pulmão: Parede de lesão cavernosa.....	64
Figura 30 – Corte histológico de Pulmão: Bacilos ácido-álcool-resistentes (BAAR), em aglomerados, no interior duma lesão cavernosa.....	64
Figura 31 – Distribuição geográfica das explorações com animais positivos no rastreio de tuberculose realizado em 2010.....	75
Figura 32 – Distribuição dos clientes de uma clinica veterinária na região de Montemor-o-Novo.....	76
Figura 33 – Evolução dos indicadores de tuberculose bovina entre 2003 e 2010.....	76

I. INTRODUÇÃO

A cabra é um animal doméstico que tem seguido o homem desde as primeiras civilizações, tendo representado um papel importante a nível económico, nutricional e em algumas regiões, religioso, assumindo-se como um animal sagrado. Atualmente e com o aumento da população mundial, este animal tem vindo a ser produzido e explorado de forma mais intensiva, melhorando o aproveitamento leiteiro e de carcaça. Fator que contribui para o aparecimento de doenças no efetivo.

Os dados apresentados ao longo desta descrição do foco de tuberculose são pertencentes a caprinos da raça Murciano-granadina e Florida que são raças de aptidão leiteira, com bons índices de produção. Estes animais eram de origem espanhola e pertenciam a uma exploração pecuária no Alentejo. Segundo Duarte e colaboradores (2008), a região do Alentejo possui a prevalência mais elevada de animais infetados com tuberculose em Portugal.

A tuberculose é uma doença infecciosa crónica conhecida desde as primeiras civilizações, tendo sido referenciada pela primeira vez em animais, por Columela, no ano 40. Mais tarde, no ano 1797, Klenke associou o consumo de leite de vaca infetado com o aparecimento de lesões. Gurlt (1831), Hering (1849) e Fuchs (1859), consideraram a tuberculose bovina como sendo idêntica à forma pulmonar humana. Só em 1868, Villemin, descobriu o carácter zoonótico da tuberculose e confirmou a capacidade de transmissão da doença dos animais ao homem e vice-versa. Finalmente, em 1882, Robert Kock descobre o bacilo da tuberculose, demonstrando a etiologia bacteriana da doença. Em 1890, desenvolveu a tuberculina, utilizada até aos dias de hoje como meio de diagnóstico (Vicente, 2004).

Define-se como tuberculose, a doença infecciosa produzida por qualquer espécie pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), embora cada espécie apresente maior afinidade por um hospedeiro em específico. No caso dos caprinos é, fundamentalmente, causada pelo *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium bovis*, sendo que o *M. caprae* é o principal agente etiológico.

A infeção dá-se principalmente por via respiratória com a exposição a aerossóis contendo micobactérias. Deste modo, as lesões características da tuberculose, geralmente, encontram-se presentes nos pulmões e gânglios linfáticos associados. A segunda porta de entrada mais frequente, é a digestiva, desenvolvendo-se lesões nos intestinos e gânglios

linfáticos mesentéricos. A doença geralmente tem uma evolução subclínica, e quando presentes, os sinais clínicos não são específicos, podendo incluir fraqueza, anorexia, emagrecimento, dispneia, hipertrofia dos gânglios linfáticos e tosse.

O diagnóstico é conclusivo, na grande maioria dos casos, após a morte dos animais, com a realização de necropsias, exames histopatológicos e bacteriológicos.

Nos caprinos, a tuberculose, causada principalmente pelo *M. caprae*, é uma doença endêmica na Península Ibérica e é um agente infeccioso emergente em bovinos (Pérez de Val *et al.*, 2011).

A tuberculose está incorporada na lista B da Organização Mundial de Saúde Animal (*Office International des Epizooties* - OIE), na qual estão incluídas doenças transmissíveis com importância para a saúde pública, com impacto sócio-económico dentro dos países e com repercussões significativas no comércio internacional de animais e de produtos de origem animal.

Em Portugal, não existe um programa de erradicação de Tuberculose Caprina, devendo-se em parte à não inclusão desta doença na lista de doenças de declaração obrigatória da OIE, nem na lista de doenças de declaração obrigatória a nível nacional. No entanto, a tuberculose é uma zoonose, constitui um perigo para a saúde pública, e como tal, é de notificação obrigatória. Por outro lado, está a decorrer desde 1987 um programa de erradicação de tuberculose bovina, baseado na prova de tuberculina, abate sistemático dos animais positivos com confirmação por diagnóstico bacteriológico e histopatológico realizado no laboratório de referência nacional, o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (LNIV/INIAV), e vigilância permanente nos matadouros por parte dos inspetores sanitários.

A legislação no âmbito do combate à tuberculose bovina em Portugal é suportada pelo Decreto-Lei n.º 272/2000 de 8 de Novembro, que estabelece as normas técnicas de execução do Programa de Erradicação da Tuberculose Bovina e de combate à tuberculose, a Diretiva n.º 64/432/CEE, do Conselho, de 26 de Junho de 1964, relativa a problemas de fiscalização sanitária em matéria de comércio intracomunitário de animais das espécies bovina e suína e a Diretiva 78/52/EEC do conselho de 13 de Dezembro de 1977, define os critérios comunitários aplicáveis aos planos nacionais de erradicação acelerada da tuberculose, brucelose e leucose enzoótica nos bovinos (Fonseca, 2011).

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Tuberculose

1.1. Género *Mycobacterium*

O género *Mycobacterium* inclui-se no Filo *Actinobacteria*, Classe *Actinobacteria*, Ordem *Actinomycetales*, Sub-Ordem *Corynebacterineae* e Família *Mycobacteriaceae*. Este género abrange mais de 120 espécies, as quais se caracterizam por: forma bacilar, dependência de oxigénio, imobilidade, ausência de formas de resistência e são ácido-álcool-resistentes (BAAR) (Rastogi *et al.*, 2001). Esta última característica é conferida pelo elevado conteúdo lipídico, principalmente ácidos micólicos, presentes na parede celular (Biberstein & Hirsh, 2003).

A classificação deste género pode ser feita de diferentes métodos, tendo em conta as características fenotípicas, a sua patogenicidade ou até mesmo os genótipos. No entanto, a classificação mais prática é aquela que utiliza as características de crescimento das micobactérias, dividindo-as em dois grupos: micobactérias não cultiváveis ou dificilmente cultiváveis e cultiváveis. Posteriormente, as cultiváveis dividem-se em micobactérias de crescimento rápido, inferior a 7 dias, e as de crescimento lento, superior a 7 dias (Garrido, 2011).

Este género abrange patogénicos obrigatórios, patogénicos oportunistas e saprófitas. O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) engloba todas as espécies causadoras de tuberculose em mamíferos, as quais passo a citar: *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. bovis* (*M. bovis* BCG – Bacilo Calmette-Guerin), *M. canetti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*. Está incluído no grupo das micobactérias de crescimento lento, de tal forma que as culturas primárias só se tornam visíveis a olho nu ao fim de 10 a 14 dias de incubação, podendo mesmo chegar às 6 a 8 semanas. (Cruickshank *et al.*, 1975; Pfyffer, 2007). A temperatura óptima de crescimento encontra-se entre 30 e 43°C, sendo o valor de referência os 36°C (Aranaz *et al.*, 1999).

Em termos morfológicos os bacilos da tuberculose são retos ou ligeiramente curvos, com um comprimento que varia de 1.0 a 10 μm e 0.2 a 0.6 μm de largura, isolado ou em pequenos aglomerados e não formam esporos, flagelos ou cápsulas (Ferreira, 1976; Biberstein & Hirsh, 2003; Pfyffer, 2007). O seu ADN possui um elevado conteúdo em guanina e citosina (G+C entre 62% a 70%) (Rastogi *et al.*, 2001). A morfologia das colónias varia entre

espécies, variando de lisas para rugosas e de não pigmentadas para pigmentadas. As colónias do tipo pigmentadas apresentam, geralmente, coloração amarela, laranja, ou, raramente, rosa, geralmente devido aos pigmentos carotenoides. Além disso, umas espécies necessitam de luz para formar pigmento, enquanto outras formam pigmentos tanto na presença como na ausência de luz (Pfyffer, 2007).

A parede celular das micobactérias tem características muito particulares que as distinguem de outros microrganismos, sendo a característica mais importante e marcante o elevado conteúdo lipídico, especialmente ácidos micólicos, responsáveis pela característica ácido-álcool-resistente; micosídeos, responsáveis pela resistência a antibióticos e desinfetantes; e glicolípidos, responsáveis pela toxicidade e sobrevivência das micobactérias fagocitadas (Biberstein & Hirsh, 2003).

As micobactérias são consideradas citoquimicamente Gram-positivas, mas na maioria das espécies a coloração pelo método Gram é difícil, pois a presença de substâncias de natureza lipídica na parede celular faz com que o bacilo só seja penetrado por corantes fortes e com auxílio de calor. Na prática a sua identificação é feita pelo método de Ziehl-Neelsen que utiliza a fucsina e como contraste emprega-se o azul de metileno ou o verde de malaquite. Uma vez corado pela fucsina, o bacilo resiste à descoloração quando submetido a uma solução ácido-alcoólica, daí a designação de bacilo ácido-álcool-resistente (BAAR) (Cruickshank *et al*, 1975).

Quanto à resistência tratam-se de bactérias com grande capacidade de sobrevivência em objetos inanimados durante semanas ou meses, desde que não estejam expostas à luz solar. São mais resistentes a antimicrobianos, ácidos, álcoois e desinfetantes do que muitas bactérias não esporuladas. Por outro lado, são altamente sensíveis à luz solar e a temperaturas superiores a 65°C durante 30 minutos (Biberstein & Hirsh, 2003; Pfyffer, 2007; Quinn *et al*, 2002).

1.2. Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

Atualmente, o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) é composto por 7 elementos que formam um grupo de organismos com uma homologia em termos de ADN de 95 a 100%, tendo a sequenciação do gene 16S rRNA mostrado que não existem diferenças de sequência entre os membros do complexo, até ao ponto de ser debatida a conveniência de reorganizar o complexo numa única espécie (Prodinger *et al.*, 2005; Aranaz *et al.*, 2003;

Aranaz *et al.*, 1999). Alguns autores, Alexander *et al.* (2010), defendem a inclusão de uma nova espécie no MTBC, o *M. mungi*, que surgiu numa exploração de mangustos, em Botswana.

A identificação destas espécies é levada a cabo para efeitos epidemiológicos, de saúde pública e terapêuticos (Pfyffer, 2007; Runyon *et al.*, 1974). Tradicionalmente é baseada em características de crescimento, como pigmentação, morfologia da colónia e taxa de crescimento, e em testes bioquímicos. Os testes mais utilizados são o de acumulação de niacina, a atividade nitrataze, suscetibilidade à pirazinamida e suscetibilidade ao ácido tiofeno-2-carboxílico hidrazida (TCH). Para completar estes estudos numéricos tem-se usado técnicas moleculares para estudos genéticos (Aranaz *et al.*, 1999).

Mycobacterium tuberculosis

O *Mycobacterium tuberculosis* foi descoberto por Robert Kock em 1882 e infeta primariamente humanos e primatas, não obstante a infeção em outras espécies (Cousins *et al.*, 2003; Ferreira, 1976). Esta variante do MTBC tem tido uma variação genética bastante baixa ao longo dos anos (Pfyffer, 2007). Esta espécie é, com certeza, o agente patogénico mais importante do complexo em termos de número de hospedeiros infetados e nas implicações que representa para a saúde pública (Aranaz *et al.*, 2003).

Mycobacterium bovis

Mycobacterium bovis (Karlson & Lessel, 1970) é o agente causador de tuberculose bovina por excelência, podendo também infetar uma ampla gama de hospedeiros domésticos e silváticos (Aranaz *et al.*, 1999). Ao contrário da maioria dos membros do MTBC, o *M. bovis* é capaz de crescer numa atmosfera baixa em oxigénio. Formam colónias em meio à base de ovo, pequenas e arredondadas, com bordos irregulares e uma superfície rugosa, enquanto que as colónias em meio de agar são pequenas e lisas (Pfyffer, 2007). O *M. bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) foi distribuído por Calmette em 1924 para laboratórios de todo o mundo, tem propriedades idênticas ao *M. bovis*, diferindo apenas no grau de patogenicidade que é muito mais atenuada. Esta estirpe tem sido utilizada como vacina (Pfyffer, 2007; Cousins *et al.*, 2003; Runyon *et al.*, 1974; Aranaz *et al.*, 1999).

Mycobacterium caprae

Em 1999, após estudos taxonómicos foi proposto um novo membro do MTBC, designado *M. tuberculosis* subsp. *caprae* (Aranaz *et al.*, 1999). Mais tarde, Niemann *et al.* (2002) incluiu-o no grupo de *M. bovis* como *M. bovis* subsp. *caprae*.

Características fenóticas dos isolados de micobactérias caprinas e a sensibilidade à pirazinamida, antimicrobiano ao qual o *M. bovis* é resistente, foram critérios importantes para diferenciarem esta espécie de *M. bovis*, passando a formar um novo elemento do MTBC com o nome de *M. caprae* (Aranaz *et al*, 2003).

O principal hospedeiro de *M. caprae* é a cabra, mas encontram-se descritos casos em bovinos, porcos, ovinos, alguns animais silváticos e no Homem. Nesta última espécie tem-se identificado tuberculose de origem caprina desde 1996 (García Marín, 2010; Aranaz *et al*, 2003).

Mycobacterium africanum

O *M. africanum* que é dividido em 2 subtipos (I e o II) foi isolado a partir de expetoração de um paciente com tuberculose no Senegal e descrito por Castets *et al*. (1969). É uma causa de tuberculose humana na África Equatorial, podendo afetar também primatas, porcos e bovinos (Aranaz *et al*, 1999; Runyon *et al*., 1974). As colónias assemelham-se a *M. tuberculosis* e as propriedades fisiológicas e bioquímicas são intermédias entre o *M. tuberculosis* e o *M. bovis*, sendo que o subtipo I está mais relacionado com o *M. bovis* e o subtipo II com o *M. tuberculosis* (Richter *et al*, 2003; Pfyffer, 2007).

Mycobacterium microti

M. microti foi identificado pela primeira vez em roedores por Wells & Oxon (1937) e a sua denominação final foi proposta por Reed (1957) (Aranaz *et al*, 1999). Agente causador de tuberculose em porcos da Índia, coelhos, lamas, gatos e outros animais de sangue quente, tendo vindo a ser identificado também em humanos. Revelam características morfológicas distintas ao esfregaço e normalmente não crescem em cultura (Pfyffer, 2007).

Micobacterium canetti

M. canetti foi isolado pela primeira vez por Georges Canetti em 1969. O facto das suas colónias serem lisas, redondas e brilhantes, faz com que seja diferente de todas as outras espécies do complexo. Na verdade, presume-se que o *M. canetti* tem cerca de 2,8 milhões de anos e, portanto, pode ser um ancestral de todos os outros membros do MTBC (Pfyffer, 2007).

Mycobacterium pinnipedi

A sua primeira denominação foi “*seal bacillus*” (Cousins *et al*, 1993), passando mais tarde a intitular-se *M. pinnipedi* (Cousins *et al*, 2003) e a fazer parte do MTBC. Os Pinípedes parecem ser o hospedeiro natural, no entanto também é patogénico para alguns roedores e para o Homem (Kriz *et al*, 2011; Pfyffer, 2007).

Estas espécies são os agentes causais de tuberculose em humanos e animais. O próximo parentesco foi confirmado por hibridação ADN-ADN, por eletroforese de enzimas multilocus, e por sequenciação do gene de ADN ribossomal 16S rRNA e 16S-23S rRNA. Apesar dessa relação estreita, as espécies do MTBC mostram grande variabilidade em suas características fenotípicas, epidemiológicas, patogénicas e na importância para a saúde pública (Kubica *et al.*, 2003; Richter *et al.*, 2003).

2. Tuberculose Caprina

A tuberculose caprina é conhecida desde o final do séc. XIX, quando Robert Kock descreve em 1884, dois anos depois de ter isolado o *Mycobacterium tuberculosis* (1882), o primeiro caso numa cabra com lesões generalizadas nos gânglios linfáticos e outros órgãos, e lesões cavitárias no pulmão, identificando posteriormente como agente causador o *Mycobacterium bovis* (Garcia Marín, 2010). Como cita Garrido (2011), segundo Aranaz (1999) muitos dos achados do MTBC identificados em cabras foram originalmente classificados como *M. Bovis* e só posteriormente, estudos fenotípicos e genotípicos propuseram a denominação destes achados como *M. Tuberculosis* subsp. *caprae* (Garrido, 2011). Uns anos depois Niemann *et al.* (2002) denominaram de *M. Bovis* subsp. *caprae* e em 2003 Aranaz e colaboradores consideraram que a subespécie deveria ser considerada como uma nova espécie do MTBC e passou a chamar-se *Mycobacterium caprae* (Aranaz *et al.*, 2003).

Tal como acontece em todas as outras espécies, a tuberculose caprina é uma infeção crónica, contagiosa e os agentes habitualmente implicados são o *M. bovis* e o *M. caprae*, embora o *M. tuberculosis* já tenha sido isolado (Bezós *et al.*, 2012). O primeiro, afeta mais a espécie bovina e o segundo afeta principalmente os caprinos (Duarte *et al.*, 2008). É principalmente uma doença do trato respiratório inferior, com lesões nos pulmões e gânglios linfáticos brônquicos e mediastínicos, podendo ocasionalmente encontrar-se lesões em outros órgãos como o baço, o fígado e gânglios linfáticos mesentéricos (Pérez de Val *et al.*, 2011).

A primeira suspeita de tuberculose num rebanho de caprinos deve ser realizada clinicamente, com a observação de sinais compatíveis com a infeção por micobactérias do MTBC. A elevada mortalidade, emagrecimento progressivo, depressão, prostração, presença de sinais respiratórios, diminuição da produção, entre outros sinais, são compatíveis com esta

doença, no entanto existe um leque de patologias que podem desenvolver estes sinais tornando imprescindível a realização paralela de uma lista de diagnósticos diferenciais, sendo os mais importantes a paratuberculose, o tumor intranasal enzoótico, artrite e encefalite caprina, actinobacilose, linfadenite caseosa e algumas broncopneumonias (García Marín, 2010; Radostitis *et al.*, 2002).

No que diz respeito à transmissão ao Homem, a tuberculose caprina é uma zoonose, tendo-se vindo a relatar casos de tuberculose de origem caprina desde 1996 (García Marín, 2010).

Existem diversos fatores que contribuem para a disseminação desta infeção, nos quais estão incluídos: as características do bacilo, altamente resistente no meio ambiente e à dessecação; confinamento dos animais, com aumento do contato entre animais infetados e não infetados; co-habitação de animais adultos com animais jovens, que possuem imunidade ainda deficiente; fatores imunossupressores, como sub-nutrição, doenças concomitantes, deficientes condições de higiene e práticas incorretas de manejo, entre outros. (Radostitis *et al.*, 2002; Atance & Vizcaíno, 1998).

Esta doença causa elevados prejuízos económicos devido ao abate de animais infetados e consequente rejeição, diminuição da produção de leite, bem como limitações ao comércio. Além disso, os caprinos infetados constituem um perigo pela sua capacidade de transmitir a doença ao Homem, bovinos e animais silváticos (Bezós *et al.*, 2012; Sanchez *et al.*, 2011).

2.1. Epidemiologia

Durante muitos anos pensou-se que a espécie caprina fosse resistente à infeção por *M. bovis*, todavia esta teoria foi rejeitada após serem descritos casos de infeção nos caprinos em vários países (Melo *et al.*, 2012). Segundo Radostitis e colaboradores (2002), todas as espécies, incluindo o Homem, e grupos etários são suscetíveis à infeção por micobactérias do MTBC, sendo os bovinos, caprinos e suínos os mais suscetíveis, ao invés dos ovinos e equinos que tem-se mostrado mais resistentes à infeção. Este facto pode-se dever a uma suposta resistência natural por parte destas espécies ou pela falta de casos relatados.

A tuberculose caprina tem aumentado nos últimos anos, tendo-se o *M. caprae* tornado um agente infeccioso emergente em bovinos (Pérez de Val *et al.*, 2011). O número de isolados de *M. caprae* a partir de amostras de bovinos tem aumentado de forma consistente desde 2004

(Rodríguez *et al.*, 2011). Esta doença infecciosa, causada maioritariamente por *M. caprae* e *M. bovis*, bem como a paratuberculose, doença causada pelo *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, são doenças endémicas nos rebanhos caprinos da Península Ibérica (Pérez de Val *et al.*, 2012).

Os rebanhos de caprinos infetados com tuberculose constituem um reservatório de infeção que representa um risco para outros rebanhos, animais silváticos e humanos. Para além disso, pode prejudicar as campanhas de erradicação da tuberculose bovina. Em Portugal é muito frequente os produtores de bovinos possuírem rebanhos de caprinos e/ou ovinos, como forma de tirarem o máximo aproveitamento das pastagens, no entanto estas duas espécies não estão incluídas no plano de erradicação da tuberculose, mas podem ser um reservatório e disseminar a doença. Os caprinos são muito suscetíveis à doença e se forem mantidos em contato com rebanhos de bovinos infetados, a incidência da doença poderá atingir 70%. Os animais silvestres e selvagens também atuam como hospedeiros permanentes e reservatório de infeção, fator que influencia a erradicação da tuberculose (Radostitis *et al.*, 2002)

Em países desenvolvidos a tuberculose no Homem tem ocorrido em casos pontuais e em pacientes idosos ou imunocomprometidos. No caso dos animais domésticos, nomeadamente os bovinos que possuem um plano de erradicação desde meados do século passado, a tuberculose ainda representa um problema grave em alguns países da União Europeia, com taxas de prevalência no rebanho até 8,2%. Em contrassenso a Alemanha foi considerada oficialmente livre de tuberculose bovina em 1997 (Kubica *et al.*, 2003). A situação da tuberculose bovina, tendo como principal agente, o *M. bovis*, dentro da União Europeia (UE) difere de país para país (Tabela 1).

A tuberculose caprina foi diagnosticada em diversos países de todo o mundo desde princípios do século XX. Na Europa, para além de Portugal, já foi descrita na Espanha, França, Itália, Alemanha, entre outros (García Marín, 2010). No Homem, a infeção por *M. caprae* não é comum, todavia, na Europa Central é a principal causa de tuberculose nos bovinos e, portanto, o agente predominante de “tuberculose bovina” para o Homem (Prodinger *et al.*, 2005).

Em Espanha, *M. caprae* representa 7.4% de todos os isolados de micobactérias pertencentes ao MTBC obtidos de animais domésticos e silvestres. Este facto deve-se ao microrganismo ser altamente patogénico para os caprinos, provocando lesões disseminadas e rápida disseminação no rebanho, mas também, à não inclusão dos caprinos nos planos de

erradicação nacional, exceto se co-habitarem com bovinos (Rodríguez *et al.*, 2011). Portanto, a infecção por *M. caprae* pode difundir-se facilmente através do movimento de animais, aquando da compra de animais de substituição ou como melhoramento genético.

A prevalência real da tuberculose caprina em Portugal não é conhecida de forma precisa, devido, principalmente, à ausência de protocolos de diagnóstico, campanhas de erradicação generalizadas e, sobretudo, a falta de reconhecimento oficial da importância desta doença em caprinos.

Em Portugal está a decorrer um programa de erradicação da tuberculose bovina desde 1987 (Duarte *et al.*, 2008). A Região Autónoma dos Açores, Madeira e Algarve são considerados livres de tuberculose bovina (Duarte *et al.*, 2008).

Tabela 1 – Situação da tuberculose bovina na UE, dados de 2010.(European Food Safety Authority (EFSA), 2012).

Situação da Tuberculose Bovina na União Europeia	
<i>Países Oficialmente Indemnes</i>	<i>Países Endémicos</i>
Bélgica República Checa Dinamarca Alemanha França Luxemburgo Holanda Áustria Eslováquia Finlândia Suécia Polónia	Portugal Espanha Reino Unido Irlanda Eslovénia Hungria Roménia Bulgária Grécia Malta Chipre Lituânia Letónia Estónia Itália
Países livres que não pertencem à UE: Noruega e Suíça	

2.2. Patogenia e resposta imunitária

A maioria dos estudos realizados sobre patogenia e resposta imunitária foram efetuados em Humanos e bovinos. Os caprinos, tal como os bovinos, são ruminantes e apresentam características fisiológicas e anatómicas semelhantes, para além disso desenvolvem, nas infeções de tuberculose, lesões cavitárias que também são um achado

frequente na tuberculose no Homem. Neste sentido, muitos dos achados descritos na bibliografia são aplicáveis a ambas as espécies (Garrido, 2011).

A tuberculose numa primeira fase forma lesões no local de infecção e no gânglio linfático satélite, designando-se de complexo primário (CP) esse conjunto de lesões. Um foco primário de infecção desenvolver-se-á após a entrada da bactéria e umas semanas depois inicia-se a calcificação das lesões (Radostitis *et al.*, 2002). A partir deste foco pode ocorrer disseminação da infecção por macrófagos contendo bacilos (Quinn *et al.*, 2002).

A infecção inicia-se com a entrada do bacilo geralmente por via aerógena ou digestiva, depositando-se em seguida nas mucosas onde irá ser captado pelos macrófagos, dando-se a ativação do sistema mononuclear fagocitário. A presença de componentes lipídicos na parede celular conferem ao bacilo resistência à destruição fagocitária, permitindo deste modo multiplicação intra e extracelular contínua (Biberstein & Hirsh, 2003; Atance & Vizcaíno, 1998). A sua multiplicação e o desenvolvimento de lesões dependerá da resistência do sistema imunitário, expressada em grande medida pela ativação dos macrófagos e da virulência da estirpe (Atance & Vizcaíno, 1998).

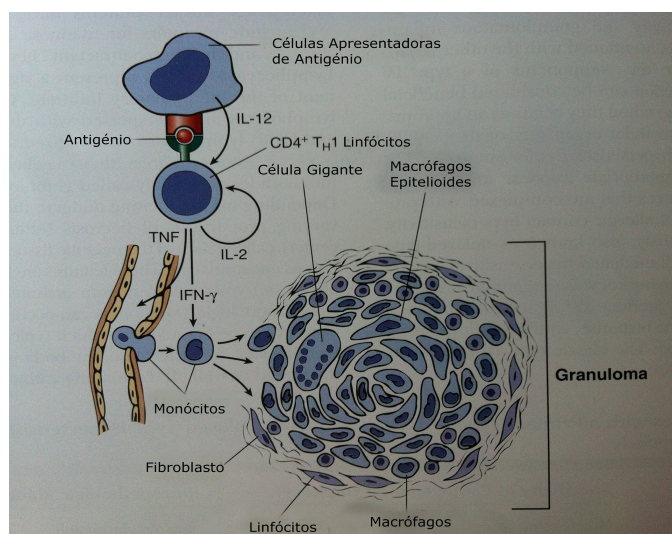


Figura 1 - Formação do granuloma tuberculoso ou tubérculo (Fonte: McGavin e Zachary, 2007).

A presença de micobactérias no interior dos macrófagos desencadeia uma resposta imune mediada por células que leva à formação do granuloma de tuberculose (Tabela 2) no órgão afetado e no gânglio linfático satélite, levando à formação do CP (Atance & Vizcaíno, 1998). Os macrófagos infetados secretam IL-12 uma citocina responsável pela estimulação de Linfócitos T CD4+ e T CD8+ para induzir a produção de gama interferão (fator estimulador

de colónias granulocíticas e monocíticas e fator inibidor de migração) que atrai e ativa macrófagos (Fig. 1) (Biberstein e Hirsh, 2003; Cotran *et al.*, 1999). Esta reação inflamatória local induzida por citocinas é uma reação de hipersensibilidade tipo IV (DTH), mediada por células, porque é o resultado da interação de linfócitos T com o antígeno específico para o qual eles foram sensibilizados, ou do tipo retardado (Tabela 4). A resposta imune resultante é mediada tanto por linfócitos T CD8+ citotóxicos como pela libertação de citocinas pelos linfócitos T CD4+. Ambos reagem através de células mediadoras, principalmente macrófagos, para produzir reações inflamatórias crônicas (McGavin & Zachary, 2007). Para além da tuberculose existem outras infeções crônicas com microrganismos intracelulares persistentes que desenvolvem DTH como representado na tabela 2.

Tabela 2 – Doenças que desenvolvem Reação de Hipersensibilidade do tipo IV (DTH) (Adaptado de McGavin & Zachary, 2007).

Doença	Especificidade patogénica dos Linfócitos T	Manifestações clínico-patológicas
Tuberculose	Antígenos <i>Mycobacterium spp.</i>	Formação de granuloma
Paratuberculose	Antígenos <i>Mycobacterium avium</i> subsp. paratuberculosis	Enterite granulomatosa
Dermatite alérgica por contacto	Haptenos (antígeno que necessita ligar-se a uma proteína para desencadear resposta imunitária)	Dermatite perivascular
Artrite reumatoide	Antígeno desconhecido presente na articulação sinovial	Artrite crónica com inflamação, destruição da cartilagem e osso
Uveíte recorrente dos equinos	Desconhecido	Uveítes

Na fase inicial de desenvolvimento da lesão, os granulomas são compostos predominantemente por macrófagos ativados ou células epitelioides (núcleo vesicular alongado e citoplasma pálido muito pouco delineado). Nesta fase ocorre uma proliferação dinâmica das bactérias e necrose dos macrófagos no local de infeção. À medida que a lesão progride, o foco necrótico caseoso tem tendência a aumentar e pode haver evolução para calcificação ou liquefação. Há formação de células gigantes de Langhans, que são provavelmente o produto da fusão de células epitelioides, e ocorre formação de um anel composto por linfócitos e células mononucleares que envolvem a lesão inicial. Muitas vezes, adquire proliferação de tecido conjuntivo na periferia, que tende a encapsular a lesão (Coetzer & Tustin, 2004).

Dependendo do grau de infecção, da resposta imunitária do hospedeiro e da virulência da estirpe infetante o desenvolvimento da doença pode tomar vários cursos. Um deles é o desenvolvimento de um processo exsudativo agudo com perda da arquitetura dos tecidos e um elevado grau de hipersensibilidade à tuberculose no caso de estirpes altamente virulentas (Biberstein & Hirsh, 2003). Por outro lado, quando a infecção por micobactérias é eficazmente travada pelo sistema imune pode ocorrer eliminação completa das bactérias do organismo ou a infecção pode passar a um estado latente que pode persistir durante vários anos sem que exista uma progressão. A reativação pode ocorrer como consequência de situações de stress ou idade avançada, quando há debilidade do sistema imune (Garrido, 2011). Pode também, ocorrer disseminação linfática e hematogênea e produzir tuberculose miliar com formação de tubérculos multifocais em vários órgãos (Biberstein & Hirsh, 2003; Radostitis *et al.*, 2002).

Tabela 3 – Comparação entre lesões granulomatosas e lesões cavitárias (Adaptado de Sanchez *et al.*, 2011).

Lesões Granulomatosas	Lesões Cavitárias
Menor poder de infecção;	Maior poder de infecção;
Necrose caseosa com focos de mineralização, rodeado de macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas, com uma área de linfócitos junto à cápsula fibrosa exterior;	Grande acumulação celular composta por neutrófilos (alguns degenerados), alguns macrófagos epitelioides envolvidos em material necrótico caseoso e liquefeito. Algumas células gigantes multinucleadas e macrófagos em redor. Externamente tecido de granulação e cápsula fibrótica;
A quantidade de BAAR é reduzida e encontram-se no interior de macrófagos e células gigantes multinucleadas;	Grande quantidade de BAAR extracelular e, alguns, intracelular;
Maior número de linfócitos T CD4+;	Maior número de linfócitos T CD8+;
Baixo número de neutrófilos.	Grande concentração de neutrófilos;
Reduzida dilatação dos bronquíolos e alvéolos.	Dilatação dos bronquíolos e alvéolos.

Para além do granuloma característico da tuberculose, são observadas, por vezes, lesões cavitárias nos pulmões de caprinos afetados, onde estão presentes numerosos BAAR (Tabela 3). Grande parte destas lesões comunicam com os brônquios e, sobretudo, com os bronquíolos, originando formas abertas de tuberculose, o que pode originar a eliminação do bacilo para o meio ambiente e assim propagar a doença ou levar à ingestão do bacilo por

deglutição, com disseminação da doença no próprio organismo (Sanchez *et al.*, 2011). Esta característica tem um papel fundamental na perpetuação e disseminação da tuberculose.

Tabela 4 – Descrição dos mecanismos de hipersensibilidade tipo I, II, III e IV. (Adaptado de McGavin e Zachary, 2007).

<i>Tipo</i>	Hipersensibilidade tipo I ou imediata	Hipersensibilidade tipo II ou anticorpo-dependente	Hipersensibilidade tipo III ou mediada por imunocomplexos	Hipersensibilidade do tipo IV ou tardia
<i>Componente imunológico</i>	IgE	IgG e IgM	IgG e IgM	Linfócitos T
<i>Antigénio</i>	Alérgeno	Antigénios na superfície de células ou tecidos	Vírus ou bactérias	Vírus, bactérias e antigénios de contato
<i>Doença tipo</i>	Alergia	Anemia hemolítica auto-imune; reação a transfusão.	Lupus Eritematoso Sistémico; Poliarterite.	Tuberculose; Dermatite de contato.
<i>Mecanismo imune</i>	Produção de IgE → libertação imediata de amina vasoativas e outros mediadores → Recrutamento de células inflamatórias.	Produção de IgG e IgM → ligam-se ao antigénio → fagocitose e lise de células alvo pelo complemento ativado e recrutamento de leucócitos	Deposição do complexo antigénio-anticorpo → ativação do complemento → recrutamento de leucócitos → libertação de enzimas e outras moléculas tóxicas.	Linfócitos T ativados → libertação de citocinas e ativação de macrófagos.
<i>Lesões</i>	Dilatação vascular, edema, produção de muco e inflamação.	Lise celular e inflamação.	Vasculite necrosante e inflamação.	Infiltrados celulares, edema, destruição celular e formação de granulomas.

2.3. Vias de infeção e transmissão

A transmissão do bacilo ocorre entre o meio ambiente, os animais silváticos, os animais domésticos, principalmente os bovinos, e o Homem. Como referido anteriormente o contágio pode ocorrer tanto por via respiratória como por via digestiva. A inalação é invariavelmente a principal porta de entrada do bacilo em animais confinados e, até mesmo, em animais que se encontram em pastoreio. Esta afirmação, tem-se vindo a comprovar ao longo dos anos, com os inúmeros estudos realizados e artigos publicados acerca das lesões e sua localização. O local de eleição para o desenvolvimento de lesões são os pulmões e os gânglios linfáticos satélite (Biet *et al.*, 2005).

Gotículas, expetoração e poeiras contaminadas transportadas pelo ar são a principal fonte de infeção por via respiratória. Em infeções aerogenas, apenas as partículas com 2 a 5

μm de diâmetro tem capacidade para atingir os espaços alveolares nos pulmões, onde são depositadas e as bactérias ingeridas pelos macrófagos. As partículas maiores ficam retidas nas vias aéreas superiores e são removidas pelo sistema mucociliar (Coetzer & Tustin, 2004).

A infecção pela ingestão ocorre quando o pasto e a água estão contaminados por fezes, resultantes de lesões intestinais ou secreções pulmonares deglutidas, secreções respiratórias, urina, corrimento vaginal e uterino e leite de animais infetados, sendo que é necessária uma grande quantidade de microrganismos (Biberstein & Hirsh, 2003; Radostitis *et al.*, 2002).

Para além destas duas vias de infecção, a entrada do bacilo pode dar-se também por via percutânea, através de feridas, e transplacentária. A infecção intra-uterina de vitelos foi descrita quando a incidência de tuberculose bovina era alta (Biberstein & Hirsh, 2003).

Existem vários fatores que contribuem para a difusão da tuberculose e aumentam a prevalência de infecção nos rebanhos e nas populações. São estes: a capacidade de resistência do bacilo no meio ambiente à dessecação e à maioria dos desinfetantes, elevada capacidade de transmissão e difusão pelos tecidos, “migrações” dos animais selvagens em busca de comida, comércio de animais e melhoramento genético, aumento da densidade e nível de contato entre animais, período de incubação muito variável, condições sanitárias precárias, a migração e a suscetibilidade de doença em indivíduos imunocomprometidos. (Biet *et al.*, 2005; Vicente, 2004; Vergara & Delgado, 2011).

A transmissão direta de tuberculose de humano para humano foi relatada em vários casos, mas é rara e surge principalmente em pacientes imunocomprometidos. Os alimentos contaminados, sendo de destacar o leite, ou o contato direto com os animais são as principais formas de transmissão da infecção para o Homem (Vicente, 2004; Kubica *et al.*, 2003). Os fatores de risco para a infecção nesta espécie incluem a intensidade da exposição, a idade, o sistema imunológico, a co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), fatores genéticos e também fatores sócio-económicos (Biet *et al.*, 2005).

Os animais silváticos albergam estirpes de *M. bovis* comuns às espécies domésticas, funcionando como potenciais reservatórios responsáveis pela reintrodução da doença em explorações livres de tuberculose (Duarte *et al.*, 2007). Estes reservatórios impedem a erradicação da tuberculose bovina em alguns países (Radostitis *et al.*, 2002).

2.4. Sinais Clínicos e lesões

O padrão de resposta depende do tipo de infecção, do hospedeiro e seu estado fisiológico e tipo de resposta imune desenvolvida, da estirpe do microrganismo e da dose infectante (Neill *et al.*, 1994). Se for uma infecção primária o primeiro contato dá-se, na maioria das vezes, por inalação de BAAR e termina com uma resposta imune mediada por células que induz hipersensibilidade e controla 95% das infecções. Em alguns casos ocorre infecção por reativação de estados latentes ou progressão e disseminação de infecções primárias, denominando-se nestes casos de infecções secundárias (Cotran *et al.*, 1999).

A sintomatologia clínica varia consoante o órgão afetado e sendo a tuberculose uma doença crónica os sinais clínicos podem tardar meses ou anos a manifestar-se (Belknap, 2002). A tuberculose clínica é tipicamente uma doença debilitante, onde os animais afetados desenvolvem um processo crónico caracterizado por emaciação progressiva, apetite e temperatura variável. Ocasionalmente, apresentam sinais localizados como hipertrofia dos gânglios linfáticos, diarreia, emagrecimento progressivo até à caquexia, pêlo eriçado, depressão e prostração. A presença de sinais respiratórios como tosse e dispneia só é evidente em animais com estados de doença muito avançada (García Marín, 2010; Biberstein & Hirsh, 2003). A tosse é crónica, profunda e produtiva, e ocorre uma ou duas vezes num período, podendo-se estimular facilmente através da compressão da faringe. Nos casos avançados, com extensas lesões pulmonares, torna-se evidente a dispneia. Nos cabritos, a doença pode ter progressão mais rápida e causar mortes precoces (Radostitis *et al.*, 2002).

À auscultação os sons pulmonares podem apresentar alterações, incluindo crepitações, sibilos e pontos silenciosos ocupados por granulomas. Sinais indicativos de fricção pleural também podem estar presentes (Smith, 1996).

Nos caprinos, a forma mais comum de tuberculose é a broncopneumonia, que se manifesta por tosse e dispneia terminal, emagrecimento crónico e progressivo e diminuição considerável da produção de leite (Vergara & Delgado, 2011). Em alguns casos, pode ocorrer ulceração intestinal com aumento dos gânglios linfáticos do trato digestivo e consequente diarreia (Radostitis *et al.*, 2002). O aumento dos gânglios linfáticos retrofaríngeos pode provocar disfagia e respiração ruidosa devido à obstrução da faringe. Os sinais clínicos apenas são evidentes em estados avançados de doença, podendo animais com extensas lesões estarem aparentemente saudáveis. A perda da condição corporal torna-se evidente à medida que a

doença progride (Quinn *et al.*, 2002). Destaca-se também a elevada mortalidade, principalmente em animais adultos.

Em determinados casos pode ocorrer disseminação linfohematogena, o que origina o aparecimento de lesões tuberculosas em outros órgãos (baço, fígado, rim, glândula mamária, entre outros). A mastite provocada pela tuberculose não é incomum e pode surgir tanto em caprinos como em outros animais domésticos, constituindo um fator importante em termos de transmissão aos descendentes e de impacto na saúde pública (Garrido, 2011). Caracteriza-se por provocar hipertrofia e rigidez, que frequentemente afeta a parte superior e os quartos posteriores do úbere (Radostitis *et al.*, 2002), muitas vezes acompanhada por hipertrofia dos gânglios linfáticos supramamários (Quinn *et al.*, 2002).

2.5. Lesões Macroscópicas

O estudo e a identificação de lesões macroscópicas características de tuberculose aquando de necropsias ou em animais submetidos a abate, constitui um método de diagnóstico simples, rápido e direto. Nos casos clinicamente suspeitos, as lesões são sempre evidentes, afetando principalmente pulmões e gânglios linfáticos regionais. Em 90% a 95% dos casos os pulmões estão afetados e em 5 a 10% o trato digestivo (Coetzer & Tustin, 2004). As lesões mínimas não produzem sinais clínicos (García Marín, 2010).

Nas fases iniciais da doença, as lesões podem ser difíceis de detetar pela inspeção *post mortem*. Essas lesões são constituídas por pequenas lesões granulomatosas, com necrose e calcificação. Pelo contrário, as lesões antigas tornam-se bem evidentes pela cápsula de tecido conjuntivo e uma área de necrose caseificada central com coloração amarela pastosa (Quinn *et al.*, 2002).

A lesão clássica da tuberculose é o granuloma tuberculoso ou tubérculo que em termos macroscópicos apresenta-se parcial ou totalmente encapsulado, com conteúdo que varia de líquido-purulento, com uma coloração amarela, a caseoso, caseo-calcário ou calcificado devido a um processo de mineralização de lesões antigas (Coetzer & Tustin, 2004; Jones *et al.*, 1997; Smith, 1996). Os gânglios linfáticos retrofaríngeos, brônquicos, mediastínicos e mesentéricos são os de eleição para o desenvolvimento destas lesões granulomatosas, facto que se deve em parte à forma de transmissão da infeção (García Marín, 2010; Coetzer & Tustin, 2004; Smith, 1996). Em mais de 95 % dos animais o diagnóstico de tuberculose é feito a partir de material destes gânglios (García Marín, 2010).

Num rebanho de cabras infetadas com tuberculose pode encontrar-se vários estados de doença e consequentemente diferentes tipos de lesões. Segundo García Marín (2010) as lesões macroscópicas podem agrupar-se em três tipos: lesões localizadas, lesões difusas e lesões cavernosas (Tabela 5).

Tabela 5 – Tipos de lesões macroscópicas observadas na tuberculose caprina (García Marín, 2010).

Lesões localizadas	Lesões difusas	Lesões cavernosas
Lesões localizadas e caseificadas visíveis, com presença de alguns bacilos. Encontram-se complexos primários e lesões nodulares focais e multifocais. Os animais geralmente não desenvolvem resposta imune humoral (negativos ao ELISA), contudo desenvolve resposta imune celular moderada (positivos a gama interferão e IDTB).	Extensas lesões caseificadas, com ou sem generalização a outros órgãos, com presença moderada de bacilos. Os animais apresentam uma fraca resposta imune humoral (negativos, duvidosos ou positivos ao ELISA), mas resposta imune celular moderada a intensa (positivos ao gama interferão e IDTB).	Lesões cavernosas com tamanho variável, com generalização a outros órgãos, necrose de liquefação e elevado número de bacilos. Os animais desenvolvem uma resposta imune humoral moderada a intensa (positivos ao ELISA) e resposta imune celular baixa a moderada (negativos ou duvidosos ao gama interferão e IDTB).

Nos caprinos os granulomas têm entre 2 a 10 cm de diâmetro e é relativamente frequente encontrar lesões cavitárias nos pulmões que se abrem para os brônquios, designando-se de “cavernas”. Estas lesões possuem elevada carga bacteriana e facilidade em eliminar o conteúdo pelas vias respiratórias superiores e, por deglutição, através do trato digestivo (Garrido, 2011; García Marín, 2010).

Na pleura, o processo inicia-se com espessamento, coloração rosa ou amarelada e pelo aparecimento de grande quantidade de nódulos (Ferreira, 1976).

As alterações a nível hepático também são comuns, desenvolvendo-se lesões idênticas às observadas em outros órgãos, assim sendo são granulomatosas, multifocais, com tamanho variável, consistência caseosa e coloração amarela. Pode observar-se também, cirrose tuberculosa com participação dos gânglios linfáticos hepato-pancreáticos (Melo *et al.*, 2012;

Ferreira, 1976). A presença de lesões granulomatosas na glândula mamária, no baço, no rim, no diafragma e no coração também estão descritas (Bernabé *et al.*, 1991b)

2.6. Lesões Microscópicas

A nível microscópico, as lesões tuberculosas possuem características específicas, que em conjunto com a identificação dos BAAR, permitem que o diagnóstico histopatológico seja fácil de efetuar. Apesar de existir características específicas de lesões tuberculosas, pode encontrar-se uma variabilidade de lesões em função da severidade e do estado de infeção. Essas lesões caracterizam-se pela presença de células inflamatórias a rodear o foco infeccioso onde se encontra a bactéria, com uma zona central de necrose caseosa, que com a evolução da doença se torna mais ou menos calcificada. Esta massa central é rodeada por células epitelioides, células gigantes de Langhans, linfócitos e macrófagos. Externamente a lesão é revestida por fibroblastos (Coetzer & Tustin, 2004; Stevens & Lowe, 2000).

Nos casos crónicos há perda quase total ou até mesmo total da arquitetura dos tecidos visualizando-se apenas zonas de calcificação e fibrose. Um estudo publicado por Jubb e colaboradores (2007) revelou que a necrose no centro do granuloma foi observada 21 dias após a infeção e as primeiras lesões de mineralização só apareceram a partir do dia 35 após infeção, o que fundamenta o carácter crónico da infeção por bactérias do MTBC.

As técnicas de diagnóstico histopatológico servem para confirmar as lesões macroscópicas, mediante a caracterização das lesões ao microscópio recorrendo à coloração hematoxilina-eosina (HE) que permite evidenciar a estrutura e a arquitetura dos tecidos e à detecção de bacilos da tuberculose pelo método de coloração de Zielh-Neelsen (ZN).

Na tuberculose generalizada, as lesões são principalmente do tipo exsudativo, com amplas zonas de necrose, caseificação e pouca calcificação. Neste caso, é frequente a presença de exsudado intra-alveolar, aumento da população de linfócitos T CD8+ em detrimento dos linfócitos T CD4+ e grande carga bacilar (Garrido, 2011). Estas lesões, muitas vezes evoluem para lesões cavitárias que ao microscópio aparecem como grandes “vacúolos”, geralmente em comunicação com os bronquíolos e com presença de BAAR.

No mesmo animal podem observar-se diferentes tipos de lesões tuberculosas. Segundo Bernabé e colaboradores (1991) as lesões microscópicas podem ser classificadas em três tipos: Lesões proliferativas, proliferativas – exsudativas e exsudativas, como representado na tabela 6.

Tabela 6 – Tipos de lesões microscópicas observadas na tuberculose caprina (Bernabé *et al.*, 1991a).

Forma predominantemente Proliferativa	Forma Proliferativa - Exsudativa	Forma predominantemente Exsudativa
Caraterizada por pequenos granulomas com uma área de necrose central devido a caseificação secundária. Estes granulomas são rodeados por células epitelioides, algumas células gigantes de Langhans, linfócitos e externamente por uma cápsula conjuntiva.	Massas com extensa necrose de caseificação e , alguns casos, com calcificação. Em redor destas massas encontram-se granulomas localizados de menor tamanho, formados por um infiltrado difuso de células epitelioides, linfócitos e células de Langhans, rodeados por uma substância proteica, presumivelmente plasma coagulado. Estas lesões frequentemente evoluem para lesões cavitárias.	Caraterizada por necrose de caseificação primária. Grandes áreas de necrose não calcificada, rodeadas por um infiltrado celular e por grandes áreas de plasma coagulado.

2.7. Diagnóstico

2.7.1. Diagnóstico *in vivo*

O diagnóstico inicial aquando de uma suspeita de tuberculose implica um exame clínico, com avaliação do estado geral do animal, presença ou ausência de sinais clínicos (tosse, dispneia, diarreia), palpação dos gânglios linfáticos superficiais e auscultação da área pulmonar. Muitas das vezes os animais não exibem sinais clínicos e a suspeita de diagnóstico dá-se com base em necrópsias de animais co-habitantes que morreram. Após formalização da suspeita são realizadas provas de confirmação de diagnóstico.

As provas de diagnóstico de tuberculose mais utilizadas em vida são a prova de intradermotuberculinização (IDTB) e a detecção de gama-interferão (IFN- γ), ambas provas oficiais no diagnóstico da tuberculose, baseadas na resposta imune mediada por células ou hipersensibilidade tipo IV.

O isolamento e identificação do bacilo faz-se a partir de amostras contendo lesões enviadas para o laboratório de referência com classificação P3, que no caso de Portugal é o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (LNIV/INIAV).

2.7.1.1. Prova Intradermotuberculinização (IDTB)

A prova de intradermotuberculinização (IDTB) consiste na inoculação do antígeno específico de micobactérias, as tuberculinas (Kock, 1890), um derivado proteico purificado (PPD – Purified Protein Derivative) obtido em laboratório. No caso da IDTB simples faz-se inoculação intradérmica de PPD bovina exclusivamente, na dose de 2000 UI, no mínimo, e no volume de cada dose de 0,1 ml. Na IDTB comparada, aplica-se PPD bovina e PPD aviária, ambas na dose de 2000 UI, no mínimo, e no volume de cada dose de 0,1 ml. Antes da aplicação deve-se conferir o prazo de validade e garantir as condições de conservação, nomeadamente a temperatura, entre 2° e 8°C (DGV, 2005).

Em termos metodológicos, a técnica utilizada nos caprinos é idêntica à utilizada nos bovinos. É aplicada a cabras com mais de 6 semanas, porque ocorre um período pré alérgico entre 3 a 6 semanas após infeção, na tábua do pescoço (Figura 3), que é considerado o local que proporciona maior sensibilidade e que se apresenta menos sujo. Faz-se a tricotomia do local de inoculação para facilitar a medição e a leitura (Figura 2) (DGV, 2005; Radostitis *et al.*, 2002). Nas cabras a IDTB comparada, geralmente, faz-se com a inoculação da PPD bovina no lado esquerdo do pescoço e a inoculação da PPD aviária do lado direito do pescoço

de forma a facilitar a leitura (Bezós *et al.*, 2012). Antes da realização da prova assegura-se que a pele está íntegra e limpa e que não existem lesões nodulares ou tumefacções que possam originar resultados enviesados.



Figura 2 – Medição da prega de pele com o uso do cutímetro.



Figura 3 – Inoculação intradérmica de PPD bovina num caprino.

Segura-se uma prega de pele de cada zona destinada à inoculação, entre o indicador e o polegar, mede-se com o cutímetro e anota-se o resultado em milímetros (mm). Deve-se garantir uma tensão uniforme no aparelho de mensuração a fim de que o critério de mensuração seja uniforme e fidedigno. De seguida, é inoculada a tuberculina com o uso de seringas esterilizadas (o Modelo McLintock é o mais utilizado), uma para cada uma das tuberculinas, no caso da IDTB comparada. Uma aplicação correta provocará, à palpação, um ligeiro inchaço, em forma de “ervilha”, designado como bolha intradérmica, em cada ponto de inoculação. A leitura ou medição da prega de pele em cada ponto de inoculação voltará a ser registada 72 horas (+/- 4 horas) depois da inoculação (DGV, 2005). A reação de hipersensibilidade do tipo IV começa a ser significativa a partir das 24 horas após o momento de contato com o antígeno, mas o ponto máximo de reação ocorre às 72 horas e pode persistir por várias semanas até desaparecer gradualmente (Garrido, 2011; Tizard, 2004).

Os resultados da prova são interpretados da seguinte forma:

- Prova de Intradermotuberculinização Simples (IDTB simples) (DGV, 2005):
 - Reação negativa: inchaço limitado, com aumento máximo de 2 mm de espessura, sem sinais clínicos, tais como edema difuso ou extenso, exsudado, necrose, dor ou reação ganglionar regional;
 - Reação duvidosa: inchaço limitado com aumento da espessura da prega de pele superior a 2 mm e inferior a 4 mm, ou seja 3 mm, sem sinais clínicos;
 - Reação positiva: aumento da espessura da prega de pele de 4 mm ou mais e/ou presença de sinais clínicos, tais como edema difuso ou extenso, exsudado, necrose, dor ou reação ganglionar regional.
- Prova de Intradermotuberculinização Comparada (IDTB comparada) (DGV, 2005):
 - Reação negativa: reação negativa à PPD bovina ou reação à PPD bovina positiva ou duvidosa, mas igual ou inferior a uma reação positiva ou duvidosa à PPD aviária;
 - Reação duvidosa: reação à PPD bovina positiva ou duvidosa e superior em 1-4 mm à reação aviária e ausência de sinais clínicos;
 - Reação positiva: reação à PPD bovina superior em mais de 4 mm à reação aviária e/ou presença de sinais clínicos, tais como edema difuso ou extenso, exsudado, necrose, dor ou reação ganglionar regional. Reação à PPD bovina superior em mais de 2 mm a reação aviária superior a 4 mm.

A reação provocada pela inoculação da tuberculina tem a forma de um nódulo, consistência mais ou menos rígida e é relativamente móvel. Nas reações mais exuberantes, pode ocorrer destruição do tecido e necrose no local de injeção, designando-se essa ocorrência de escara. Um exame histológico do local da reação mostrou a presença de infiltrados de células mononucleares, nomeadamente linfócitos e macrófagos, apesar de numa fase inicial estarem presentes neutrófilos (Tizer, 2004).

Os animais em que a IDTB tenha dado resultado positivo, serão submetidos a abate sanitário no prazo de 30 dias subsequentes à data de notificação oficial e os animais que tenham obtido resultado duvidoso devem ser submetidos a nova prova de IDTB passados 42 dias, como prazo mínimo (DGV, 2005).

A prova de IDTB pode originar resultados falso negativos quando o tempo entre duas provas não perfaz os 42 dias como mínimo, e ainda não terminou o fenómeno de dessensibilização causado pela tuberculina, quando ocorre nos animais infetados um período de dessensibilização imediatamente antes e após o parto, apresentando cerca de 30% destes animais reações falso negativas, e devido a situações de anergia, onde animais com lesões de tuberculose visíveis não reagem ao teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo IV ou retardada (Radostitis *et al.*, 2002).

Como Portugal não possui um plano de erradicação para a tuberculose caprina as explorações não tem uma classificação atendendo ao estatuto sanitário, ao contrário do que acontece em algumas regiões de Espanha (C1, C2+, C2-, C3 e CS).

2.7.1.2. Detecção de Gama-interferão (IFN- γ)

O teste gama-interferão (IFN- γ) é utilizado como teste complementar à IDTB, no caso dos bovinos, em explorações não oficialmente indemnes de tuberculose que apresentem animais duvidosos à prova da tuberculina e com o objetivo de evitar o abate total, nas explorações que apresentam sucessivamente animais positivos à IDTB ou nas explorações que apresentam uma percentagem significativa de animais positivos a uma única IDTB (DGV, 2005).

Esta técnica tem o mesmo fundamento que a IDTB (hipersensibilidade tipo IV ou retardada), como objetivo, aumentar a sensibilidade e a detecção de animais infetados e baseia-se na libertação de IFN- γ a partir de linfócitos sensibilizados. É realizada em duas fases, a primeira consiste na colheita de sangue total e seu envio para laboratório, para ser estimulado com PPD bovina, PPD aviária e com solução salina tamponada com fosfato como controlo negativo. É incubado durante 16 a 24 horas, a uma temperatura de cerca de 37°C e em atmosfera humidificada (Bezós *et al.*, 2012; OIE, 2009). A segunda fase consiste na detecção e quantificação do IFN- γ a partir do plasma mediante uma técnica de ELISA (OIE, 2009).

A colheita do sangue faz-se a efetivos que tenham realizado a última IDTB no mínimo à 42 dias e antes da IDTB seguinte. Os tubos destinados à colheita de amostras de sangue devem ser obtidos no LNIV/INIAV ou em qualquer outro laboratório credenciado para efetuar o teste. Estes tubos devem conter heparina, que é o anticoagulante recomendado para esta prova, e devem chegar ao laboratório até 8 horas após a colheita (DGV, 2005; Gutiérrez *et al.*, 1998).

Em determinados países, como Reino Unido e Nova Zelândia, utilizam-se outros antígenos, como é o caso do ESAT-6 e do CFP-10 presentes no *M. tuberculosis*/ *M. bovis*/ *M. caprae*, com o objetivo de aumentar a especificidade da prova (Garrido, 2011; OIE, 2009).

Para além destas duas provas foram desenvolvidas outras técnicas com o objetivo de aumentar a especificidade e sensibilidade na deteção de animais infetados com tuberculose. O ensaio de proliferação de linfócitos é uma prova *in vitro* que compara a reatividade dos linfócitos periféricos à PPD bovina e PPD aviária, mas é um teste relativamente caro e ainda com necessidade de comparações laboratoriais. Existe também um teste ELISA que permite a deteção de anticorpos, é um teste simples, muito fiável na deteção de animais anérgicos às provas de IDTB e IFN- γ , mas com sensibilidade limitada, principalmente, devido ao desenvolvimento lento e irregular da resposta imunitária humoral à tuberculose (OIE, 2009).

2.7.2. Diagnóstico *post mortem*

Os métodos de diagnóstico *post mortem* assumem um papel importante na confirmação da presença de tuberculose no animal e sobretudo no rebanho, bem como a identificação da estirpe causadora de doença. Os estudos histopatológico e bacteriológico são os principais testes de confirmação, devendo ser complementados com técnicas de deteção de ADN micobacteriano como o PCR e técnicas de tipificação molecular como o RFLP e *Spoligotyping* que permitem identificar a espécie e estirpe causadora da infeção.

2.7.2.1. Diagnóstico histopatológico

As amostras contendo lesões, são geralmente obtidas do pulmão e dos gânglios linfáticos mediastínicos e bronquiais. Estas amostras chegam ao laboratório em formol ou refrigeradas, para passarem por um processo de fixação (Formol), desidratação (substituição da água por álcool), diafanização (xilol), inclusão com parafina (formação de um bloco) e, por fim, a microtomia que consiste na realização de cortes histológicos, recorrendo ao micrómetro, que serão corados posteriormente.

O diagnóstico histopatológico é utilizado como meio complementar *post mortem* para confirmar o diagnóstico das lesões macroscópicas e realiza-se em duas vertentes, uma delas, a coloração por hematoxilina-eosina (HE) é considerada a principal técnica de coloração de

tecidos em histologia. Através desta técnica pode-se diferenciar porções basófilas de porções acidófilas. A hematoxilina tem afinidade por substâncias básicas, como o núcleo e o retículo endoplasmático rugoso, onde existe grande quantidade de proteína (grupo amina), e cora as estruturas de azul ou roxo. A eosina tem afinidade por substâncias ácidas, como o citoplasma, e cora as estruturas de vermelho ou rosa. Para detecção do bacilo realiza-se a coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) que permite apenas confirmar a presença de micobactérias e quantificá-las (García Marín, 2010).

As características histológicas da lesão típica de tuberculose incluem: 1) uma zona central de necrose caseosa, composta por material eosinofílico homogêneo com detritos nucleares e grau variável de mineralização; 2) um manto de células epitelióides (macrófagos ativados) e células gigantes de Langhans (originadas pela fusão de macrófagos); 3) uma camada mais externa composta por linfócitos e macrófagos; e 4) encontra-se a rodear a lesão uma camada de fibroblastos que com a evolução da lesão forma uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso (Jubb *et al.*, 2007).

Como já foi mencionado ao longo deste trabalho, outra lesão comum que é frequentemente observada na tuberculose caprina é a lesão cavitária, onde as secções desta revelam acumulação celular marcante sob a superfície luminal da cavidade, que consiste em neutrófilos intatos ou degenerados, alguns macrófagos epitelióides misturados com material necrosado caseoso e liquefeito. A zona periférica é formada por tecido de granulação infiltrado com pequeno número de macrófagos e linfócitos e rodeado por cápsula fibrótica espessa. Em redor destas lesões observam-se bronquíolos e alvéolos dilatados com presença de macrófagos alveolares (Sanchez *et al.*, 2011).

2.7.2.2. Diagnóstico bacteriológico

O diagnóstico bacteriológico é o método mais específico, contudo uma das principais características das micobactérias é o seu lento desenvolvimento, necessitando de intervalos de tempo consideráveis até obter-se resultados e tem sensibilidade moderada. A partir das colónias obtidas pode realizar-se *Spoligotyping* do DNA micobacteriano, facultando a identificação da espécie e estirpe causadora de infeção, podendo usar-se como método de diagnóstico da tuberculose caprina em estudos epidemiológicos (García Marín, 2010).

Para a realização eficaz dos estudos bacteriológicos, bem como histopatológicos, é imprescindível o envio de amostras das lesões macroscópicas, uma vez que a lesão típica da

tuberculose tem um carácter focal, não afetando o tecido adjacente. Assim sendo, o êxito deste método depende em grande parte da amostra selecionada e enviada para laboratório (García Marín, 2010).

Após recolha, as amostras são processadas de acordo com os critérios da OIE (2009), são eles os seguintes: recipientes limpos e, de preferência estéreis, de forma a evitar contaminação cruzada aquando da cultura; sempre que possível, embalagens de plástico, descartáveis, de uso único e com cerca de 50 ml de capacidade; devem ser seladas e embalados adequadamente para evitar fugas e resistir a tensões externas; e na suspeita de material zoonótico as amostras devem ser transportadas na categoria de mercadorias perigosas.

As amostras devem sofrer um processo de homogeneização e descontaminação, recorrendo a uma solução de hidróxido de sódio de 2 a 4%, impedindo deste modo o crescimento de microrganismos contaminantes no meio de cultura que iriam interferir no crescimento das micobactérias. (OIE, 2009; Duarte *et al.*, 2008; Vicente, 2004; Laidlaw, 1978). Muitas vezes utiliza-se uma cultura em placa de agar sangue para avaliar a eficácia do método de descontaminação.

Após a descontaminação realiza-se a sementeira, a partir do macerado, recorrendo a meios de cultura sólidos, como o Lowenstein-Jensen com piruvato, Lowenstein-Jensen com hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) ou o Stonebrink, e meios de cultura líquidos, como é o caso do Middlebrook (Duarte *et al.*, 2008; Vicente, 2004). As culturas são incubadas durante um período de 6 a 8 semanas, a uma temperatura média de 37°C, na ausência ou presença de CO₂ (OIE, 2009; Pfyffer, 2007; Gruickshank *et al.*, 1975).

Os melhores meios de cultura são os meios à base de ovo, com o uso completo do ovo ou apenas a gema, sendo o Lowenstein-Jensen o mais utilizado (Pfyffer, 2007). O meio de Lowenstein-Jensen com piruvato é usado principalmente para o isolamento de *M. bovis*, que é inibido pelo TCH ou pelo uso de glicerina. Pelo contrário o meio com TCH e glicerina, tem se mostrado eficaz no desenvolvimento do *M. tuberculosis* (Laidlaw, 1978). As colónias formadas são pequenas, arredondadas, rugosas, com bordos irregulares e coloração creme-amarelada (Gruickshank *et al.*, 1975).

O meio líquido Middlebrook 7H9 juntamente com o sistema radiométrico BACTEC permitem reduzir o tempo de isolamento comparativamente com os meios sólidos (Pfyffer, 2007). Este sistema de monitorização contínua, automatizado, tem sido desenvolvido para detetar o crescimento das colónias de micobactérias. As amostras ao entrarem neste sistema

são identificadas por meio de um código de barras, facilitando posteriormente a sua localização no interior da câmara. Quando o sistema deteta o crescimento das colónias imite um sinal sonoro, sendo que no momento da retirada da cultura faz-se novamente a leitura do código de barras e assume-se a sua saída. Quando não ocorre qualquer crescimento e, portanto, os resultados são negativos, este sistema, emite também, um sinal sonoro passadas as 6 semanas.

A fase seguinte, a identificação, realiza-se sempre mediante um lento e complexo estudo de caracteres microbiológicos e bioquímicos, baseado em padrões selecionados por Wayne e Kubica (Vicente, 2004).

2.7.2.3. Diagnóstico Molecular

As técnicas de biologia molecular que estudam o genoma das micobactérias permitem a diferenciação das espécies e estirpes do MTBC, o que faz com que tenham uma grande importância nos estudos epidemiológicos, como ferramenta para classificação taxonómica (Aranaz *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 1998). No entanto, a homologia genética que existe entre os membros do complexo MTBC tem dificultado o desenvolvimento de técnicas moleculares específicas de diagnóstico e tipificação (Duarte *et al.*, 2007).

As principais técnicas e métodos utilizados nos estudos de epidemiologia molecular atuais da tuberculose animal e humana são as sondas moleculares, o PCR (Reação em cadeia polimerase), técnicas de análise de fragmentos de restrição (RFLP) e Spoligotyping.

As sondas moleculares são fragmentos de ácidos nucleicos cuja sequência de nucleótidos é complementar de outra, específica do complexo, género ou espécie. Tem a vantagem de poder realizar-se diretamente a partir das amostras sem necessidade de cultivo prévio, mas tem sensibilidade discutível. A *Southern blot* é a mais utilizada e consiste na identificação de um fragmento de ADN, com determinada sequência, num conjunto de fragmentos através de eletroforese, por hibridação, com o auxílio de uma sonda complementar marcada radioativamente, visualizando-se com autorradiografia (Vicente, 2004).

O PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é a principal técnica de amplificação de ácidos nucleicos micobacterianos, podendo conseguir amplificações de sequências específicas de ADN, a partir de oligonucleótidos desejados (primers), aos quais vão-se unindo nucleótidos até se formarem cadeias com um tamanho detetável (Vicente, 2004). É fundamental conhecer aprofundadamente as sequências, já que muitas vezes são detetadas apenas quantidades

insignificantes de ADN. Esta técnica diferencia-se pela sua fiabilidade, rapidez, facilidade de execução e aplicação clínica e epidemiológica (Vicente, 2004).

Dentro das técnicas de análise dos fragmentos de restrição, a primeira a ser desenvolvida foi a REA (*Restriction Endonuclease Analysis*) que se baseava no reconhecimento de sequências específicas de ADN através das endonucleases e posterior separação por eletroforese. Apresentava o inconveniente de ser de difícil interpretação devido ao elevado número de bandas obtidas. Muito mais recente, mais utilizada e mais importante é a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Nos dias de hoje, esta técnica, juntamente com o Spoligotyping é a principal técnica de tipificação, permitindo ir para além da espécie, tendo ganho importância internacionalmente, pelo que tem sido integrada nos planos de controlo sanitário de muitos países (Vicente, 2004).

O RFLP baseia-se no estudo completo do ADN micobacteriano através de marcadores PGRS, Repetições diretas (DR), sequências VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) e do número de vezes que se repete a sequência de inserção IS6110 e IS1081, mas principalmente a primeira, bem como a disposição da mesma no genoma, segmentando o ADN em fragmentos de longitude variável mediante enzimas de restrição (Gómez *et al.*, 1998). A sequência de inserção IS6110, apresenta um número variável de cópias nas espécies do complexo MTBC. No caso do *M. tuberculosis* oscila entre 6 e 19, enquanto que o *M. bovis* pode ir de 1 a 5 e, por fim, o *M. caprae* pode apresentar de 5 a 7 cópias. O Spoligotyping embora seja fundamental para identificar isolados de *M. caprae*, tem se mostrado pouco útil no que diz respeito à discriminação dos mesmos, exibindo em 50% dos isolados ausência de espaçadores 1, 3 a 16, 30 a 33 e 39 a 43 (Prodinger *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 1998). Portanto a associação com o RFLP – IS6110 é altamente discriminatória, mas torna-se dispendiosa, necessita de maior quantidade de ADN, requer cultivo prévio e portanto, mais tempo. (Vicente, 2004).

O Spoligotyping foi desenvolvido pela primeira vez por Kamerbeek *et al.* (1997) e baseia-se na identificação e determinação da presença ou ausência de espaçadores conhecidos como DVR (*Direct Variant Repeat*) existentes na região genómica denominada DR (*Direct Repeat*) (Fig. 4) (Duarte *et al.*, 2007; Aranaz *et al.*, 1999). Inicialmente realiza-se um PCR com dois *primers* complementares Dr-a e Dr-b (marcado com biotina) (Aranaz *et al.*, 1999), a partir daí os produtos resultantes contatam com uma membrana com os espaçadores do *locus* DR, dando-se a hibridação (Vicente, 2004). De seguida, adiciona-se uma enzima que vai ligar-se aos produtos do PCR marcados com biotina, com um líquido de deteção que emite luz

na presença desta enzima (sinal de quimioluminescência), visualizando-se à posteriori mediante autorradiografia. Posteriormente, estabelece-se as relações filogenéticas entre estirpes, recorrendo a um sistema informático (Duarte *et al.*, 2007; Vicente, 2004). Tem a vantagem de ser específica para o Complexo MTBC, permitindo a diferenciação entre espécies, principalmente aquelas estirpes que apresentam apenas uma cópia de IS6110.

[illegible]

Em suma, recomenda-se a tipificação das estirpes por Spoligotyping inicialmente e só posteriormente com o RFLP de IS6110, aplicado às estirpes com perfis de spoligotyping mais comuns.

A tuberculose é uma doença com caráter particular, apresentando diversas características que conferem resistência e que permitem a sua disseminação no ambiente e nos hospedeiros que afeta, razões essas que contribuíram para a preservação desta doença desde a antiguidade até aos dias de hoje. Apesar de ser uma doença de erradicação e controlo difícil existem diversas medidas que podem ser tomadas de modo a contrariar este facto. Deste

modo pode-se intervir com base no rebanho e no animal, com base numa determinada área e com o tratamento dos produtos de origem animal.

O controlo da tuberculose nos países que hoje são considerados desenvolvidos faz-se em grande medida pela implementação de programas de erradicação. Em muitos deles, onde esta medida foi aplicada conseguiu-se a erradicação da tuberculose bovina e consequentemente a diminuição da tuberculose humana de origem bovina. No entanto, segundo Radostitis e colaboradores (2002) a erradicação completa da tuberculose num determinado país não é alcançada e ocorrem sempre episódios pontuais. A associação de testes de diagnóstico em vida (IDTB) e abate sanitário dos animais positivos tem constituído o método de eleição.

Existem inúmeros entraves à realização de programas de erradicação adequados e eficazes e o sucesso destes depende da disponibilidade e estabilidade política de um país, bem como de recursos financeiros adequados. Para além disso, é necessário o envolvimento de veterinários experientes, administradores de saúde animal e um diagnóstico laboratorial fiável e eficiente. Também deve ter-se em conta que a ocorrência de tuberculose nos animais selvagens é uma das maiores barreiras para o sucesso da erradicação (Coetzer e Tustin, 2004).

Para o sucesso de um programa de erradicação são necessários determinados requisitos, tais como, o controlo total do movimento de animais, quarentena de todos os animais adquiridos e introduzidos na exploração, identificação obrigatória de todos os rebanhos, incentivos aos proprietários pelo abate de animais infetados, testes de diagnóstico obrigatórios a todos os rebanhos, estabelecimento e manutenção de áreas livres de infeção, com o objetivo de se estender a todo o país e recursos materiais e humanitários que garantam o cumprimento dos objetivos (Coetzer e Tustin, 2004).

Nos rebanhos que obtiveram resultados positivos no diagnóstico, tendo-se procedido ao abate dos animais, deve-se prevenir a disseminação da doença com base na desinfecção das instalações no caso de pavilhões e sistemas de produção intensivos, comedouros e bebedouros, recorrendo a desinfetantes à base de fenol. Recomenda-se, conjuntamente, a realização de vazio sanitário com uma duração mínima de 42 dias.

A pasteurização, igualmente, constitui um método eficaz para reduzir a propagação da doença quer para o homem, quer para animais alimentados com leite. Todavia, esta técnica de tratamento térmico nem sempre é eficaz na destruição de bacilos da tuberculose, dependendo do tempo e da temperatura de pasteurização, da qualidade do leite, do teor de células e da presença de pus (Coetzer e Tustin, 2004).

É de referir, ainda, a existência de vacinas com a estirpe BCG. Contudo este procedimento tem maior impacto em medicina humana, uma vez que a eficácia nos animais é controversa e interfere com os testes de diagnóstico para despiste da doença.

No que diz respeito aos caprinos não existe um programa de erradicação da tuberculose nesta espécie em Portugal, nem na maioria dos países da Europa. Exceção é a Espanha que apresenta um programa de erradicação associado ao programa aplicado nos bovinos. Em Portugal, o controlo desta zoonose, nos pequenos ruminantes, é feito com base na inspeção nos matadouros, impedindo que os animais positivos entrem na cadeia alimentar, e na realização de provas de diagnóstico mediante suspeita veterinária com posterior abate dos animais que obtiverem resultado positivo.

2.9. Importância para a Saúde Pública e impacto económico

Ao longo dos anos vários fatores têm contribuído para que as doenças de origem animal, designadas de zoonoses, constituam um grave problema de saúde pública. Está-se a presenciar um aumento da população mundial o que tem implicado uma série de medidas para suportar este facto. A intensificação das práticas agrícolas, envolvendo um elevado número de animais ou várias espécies dentro de uma mesma região ou até mesmo a invasão contínua do homem aos habitats naturais devido ao crescimento populacional. As próprias mudanças climáticas têm contribuído para a optimização de condições que favorecem o desenvolvimento de alguns vetores e permitem o ressurgimento de doenças já conhecidas ou o surgimento de novas. Além disso a globalização e o movimento em larga escala de pessoas, animais, alimentos ou bens tem proporcionado uma rápida disseminação de infeções, bem como o turismo que tem aumentado exponencialmente nos últimos anos. Outro aspeto importante é o facto de que para algumas infeções, a transmissão zoonótica não ocorre pelo contato direto mas sim indiretamente, ou seja, através de alimentos de origem animal contaminados

Zoonoses associadas à arte de caçar e posterior banquete de peças de caça selvagem tem sido uma preocupação a nível mundial. Esta carne é considerada uma iguaria por muitos, o que resultou num aumento desta atividade. A captura dos animais, o manuseamento, a desmancha, muitas vezes realizada a campo, e o transporte da carcaça constituem um risco de transmissão de infeções cruzadas, quer para o homem, quer para outros animais, como os cães utilizados na caça (Cutler *et al.*, 2010).

As repercussões económicas da tuberculose são inúmeras, quer para as explorações de animais infetados, quer para a garantia da saúde pública. Nas explorações afetadas, as principais perdas ocorrem a nível da produção de leite, que apresenta uma quebra marcada nos animais infetados, no abate de animais positivos ao teste de diagnóstico, que pode estender-se ao abate sanitário total do efetivo quando a prevalência da doença é elevada. Além disso, diminuem a atividade reprodutiva, com redução dos partos e aumento do número de mortes neonatais.

Até à chegada do produto final ao consumidor, neste caso produtos de origem animal, ocorrem diversas etapas e procedimentos que requerem vários intervenientes que poderão ser afetados num surto de tuberculose. O produtor é o mais afetado, com a diminuição da produção dos animais, perdem 10 a 25% da capacidade produtiva, e/ou com o abate destes. Em seguida os transportadores de produtos de origem animal, que levam o leite até à indústria e os animais até aos matadouros para serem sacrificados, a própria indústria encara uma diminuição no fornecimento das matérias primas e consequente diminuição de vendas, bem como o consumidor que pode deparar-se com uma falha neste sistema e no diagnóstico da tuberculose levando a uma consequente infeção.

O desenvolvimento e a aplicação de um programa de erradicação com o fim de controlar e erradicar a tuberculose ao nível de um determinado país, necessita de um financiamento considerável, pois são necessárias equipas veterinárias para aplicarem as medidas implementadas nos rebanhos, o fornecimento das tuberculinas é assegurado pelo estado e são aplicadas indemnizações pelos animais positivos que serão abatidos. Estes programas tem como objetivo reduzir a prevalência da doença, melhorando a situação sanitária, diminuindo os riscos para a saúde pública, permitindo que as explorações sejam mais rentáveis economicamente e possibilitar a exportação de animais.

Em países com programas de erradicação da tuberculose raramente é encontrada evidência clínica de infeção, porque o teste da tuberculina permite um diagnóstico presuntivo e eliminação dos animais infetados antes que os sinais apareçam (WHO, 2011).

A possibilidade de animais silváticos albergarem estirpes de micobactérias comuns aos animais domésticos, funcionando como potenciais reservatórios responsáveis pela reintrodução da doença em explorações livres de tuberculose, tem sido um tema amplamente debatido em vários países e constitui um fator que pode colocar em causa a eficácia dos programas de erradicação (Duarte *et al.*, 2007).

Segundo dados da OMS (Organização Mundial de Saúde), atualmente existem cerca de dois mil milhões de pessoas que estão infetadas com tuberculose, o que representa um terço da população mundial, e destas pessoas uma em cada dez acaba por desenvolver a doença, o que faz desta um grave problema de saúde pública. A ativação da doença ocorre, geralmente, em indivíduos imunocomprometidos como consequência da infeção pelo vírus HIV/SIDA. O maior número de casos novos ocorre no Sudoeste da Ásia, mas as taxas de incidência e mortalidade são muito mais significativas na África. A Europa com uma prevalência de 5%, juntamente com a América são os continentes menos afetados (Abalos & Retamal, 2004).

Em Portugal, a incidência anual da tuberculose humana tem vindo a diminuir, com um decréscimo anual de 6,4% entre 2002 e 2011, dados da Direção Geral de Saúde – Ministério da Saúde. Por enquanto, Portugal continua entre os países com incidência intermédia.

A transmissão de tuberculose entre o Homem e os animais tem sido comprovada por diversos estudos e as espécies mais implicadas são o *M. bovis* e *M. caprae*. A infeção por estas espécies no Homem é devida ao consumo de leite não submetido a tratamento térmico proveniente de animais infetados e pelo contato direto com animais infetados, o que será a forma mais frequente no caso dos produtores, dos veterinários e dos tratadores de gado (Garrido, 2011).

O *M. tuberculosis* é invariavelmente o principal agente da tuberculose humana, mas é igualmente verdade que o *M. bovis* é o agente mais frequente de origem animal e o *M. caprae* também pode ser uma fonte de contágio de tuberculose para o homem.

A infeção de origem bovina é especialmente importante por ser uma zoonose de distribuição mundial que apresenta variações de prevalência em distintos países. Nos países considerados desenvolvidos está erradicada ou encontra-se em fase avançada de erradicação, por outro lado nos países em vias de desenvolvimento continua sendo em muitos casos uma doença endémica (Garrido, 2011). Atualmente, nos países desenvolvidos a transmissão da doença entre bovinos e humanos é muito rara, contudo pode ocorrer (Radostitis *et al.*, 2002).

Cada vez mais é necessário agir e tomar medidas preventivas no sentido de aumentar a vigilância de doenças que possam constituir um perigo para a saúde pública. Para isso, é necessário a intervenção veterinária, bem como de todos os elementos responsáveis por esta área, ao nível dos animais domésticos, animais silváticos e dos alimentos de origem animal, fazendo um diagnóstico o mais precocemente possível da doença e investigando medidas de controlo a ser aplicadas para evitar a propagação da doença.

III. ESTUDO DE UM SURTO DE TUBERCULOSE CAPRINA

Finalizados 5 anos de Licenciatura em Medicina Veterinária com Mestrado Integrado na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, seguiu-se o estágio curricular final em espécies pecuárias, maioritariamente ruminantes, realizado na Clínica veterinária Vet +, Serviços Veterinários, Lda, em Montemor-o-Novo, Região do Alentejo, com início no dia 1 de outubro e término no dia 30 de abril, fazendo um total de 7 meses. Durante este período, acompanhou-se um surto de tuberculose num rebanho de caprinos leiteiros, com seguimento do caso, evolução, diagnóstico, abate sanitário do efetivo no matadouro de Beja e confirmação de diagnóstico mediante cultura e identificação da espécie causadora de doença por métodos moleculares no LNIV/INIAV.

1. Objetivos

- 1) Estudar um surto de tuberculose caprina.
- 2) Apresentar e analisar os meios de diagnóstico disponíveis e utilizados.
- 3) Identificar e discutir os riscos presentes na exploração.

2. Material e Métodos

2.1. Caracterização da Exploração

A exploração de caprinos, localizava-se no sítio do Paião, Município de Montemor-o-Novo, Região do Alentejo, era do tipo intensivo, com um pavilhão com uma área de 890 m², sendo que destes, 800 m² eram respetivos aos parques das fêmeas e cabritos, sistema de ordenha e um pequeno espaço de arrumação e os restantes 90 m² correspondiam ao parque dos machos. Tinham ainda uma zona descoberta inerente ao pavilhão que dispunham de acesso permanente. Para além disso, nos dias de sol tinham acesso a um terreno de pastoreio nas imediações do pavilhão com cerca de 2 hectares, devidamente vedado, permanecendo no local 1 a 2 horas.

O pavilhão era dividido em 9 parques, com 5 parques de um dos lados e 4 do outro (Fig. 6). A ala dos 5 parques era a maior, pertencia às cabras da raça Murciano-granadina e aos machos e estava dividida da seguinte forma: cabras paridas e respetivos cabritos, cabras

em lactação, cabras em cobrição, cabras em final de gestação e recém-paridas, e um parque de machos (raça Murciano-granadina). A ala dos 4 parques dividia-se da mesma forma com a exceção de não possuir parque de machos. Os parques eram divididos por grades metálicas, possuíam bebedouros automáticos, ripados em metal para a palha e concentrado, lâmpada de aquecimento no parque das paridas, água canalizada fria e quente, e luz elétrica. A alimentação era à base de palha e concentrado comprados, salvo raras exceções onde era introduzido milho em grão.



Figura 5 – Ordenha da exploração em estudo.



Figura 6 – Pavilhão da exploração dividido por parques.

Tratava-se de um efetivo de aptidão mista, portanto com produção de cabritos que eram vendidos com cerca de 2 meses e produção de leite cujo destino era a indústria do queijo fresco. A ordenha, realizava-se duas vezes por dia, num sistema com capacidade para 24 cabras (Fig. 5), com uma produção média por cabra de 1,5 litros de leite/dia. Quanto aos cabritos, na data em que surgiu a suspeita de tuberculose no rebanho, tinham entre 30 e 45 dias de idade, eram alimentados com leite das mães e concentrado, tendo como destino a época do Natal.

A esta exploração tinham acesso habitual o dono, a esposa, os dois filhos, os dois empregados e o veterinário responsável. Como animais co-habitantes, existia um cão e vários gatos.

O chão do pavilhão era forrado por completo com palha e era limpo semestralmente por uma empresa da área. Os animais eram colocados no pasto, as grades, comedouros e bebedouros eram retirados e toda a palha/estrupe era removida com o auxílio de tratores. Após esse processo era realizada desinfecção do pavilhão e o estrume era vendido.

O plano profilático da exploração consistia no rastreio anual da brucelose que é obrigatório para os pequenos ruminantes em Portugal desde 1992, vacinação e desparasitação dos animais por lotes, de modo a cumprir os intervalos de segurança sem interferir com a produção de leite. Quanto ao estatuto sanitário foi classificado como indenne a brucelose (B3) no último rastreio, que foi efetuado em março de 2012, apenas aos caprinos da raça Florida, uma vez que os caprinos da raça Murciano-granadina foram comprados depois.

2.2. Caracterização da Amostra

Inicialmente esta exploração era constituída por caprinos cruzados, que foram substituídos em setembro de 2011, após a compra de caprinos da raça Florida a uma exploração da freguesia do Vimieiro, concelho de Arraiolos, que eram originários de Espanha. Em abril de 2012 chegaram à exploração os caprinos da raça Murciano-granadina, provenientes da cidade de Saucejo, província de Sevilha, Andaluzia.

Numa primeira fase, para o cálculo da mortalidade, a amostra utilizada era composta por 325 fêmeas da raça Murciano-granadina, 54 fêmeas da raça Florida e 13 machos da raça Murciano-granadina, que compunham o efetivo da exploração em estudo.

Após o cálculo da mortalidade a amostra passou a ser constituída por 316 fêmeas da raça Murciano-granadina, 37 fêmeas da raça Florida, 13 machos da raça Murciano-granadina e 110 cabritos. Dada a origem dos animais dividiram-se os mesmos em 2 grupos: um grupo de 329 caprinos da raça Murciano-granadina e um grupo de 37 caprinos da raça Florida.

2.3. Exame Clínico

A tuberculose é caracterizada por afetar qualquer tipo de hospedeiro independentemente da idade raça ou sexo. Neste caso em particular os cabritos não desenvolveram qualquer sinal clínico que induzisse à suspeita de tuberculose, com exceção de algumas mortes, as quais não se estabeleceu a etiologia. Este facto deve-se em parte à idade dos cabritos, entre 30 e 45 dias, como foi referenciado anteriormente existe um período de pré infeção que pode durar até 6 semanas.

Os primeiros sinais clínicos, não muito evidentes, foram observados nos animais adultos no mês de outubro, com a diminuição da produção de leite a ser notada e a ganhar

importância. Apenas afetavam uma pequena percentagem do efetivo, sendo o sinal mais fácil de observar e mais frequente a tosse seca, acompanhada de emagrecimento progressivo, anemia e diminuição da produção de leite, que no final, ou seja, antes da realização da prova de IDTB atingiu uma quebra superior a 20% (dados segundo o produtor). Os animais que obtiveram resultado negativo na prova de IDTB continuaram a ir à ordenha e o respetivo leite a ser vendido.

Ao longo do tempo e com o desenvolvimento da doença, acentuou-se a perda de condição corporal, ocorria deterioração do estado geral dos animais, com pelo seco e arrepiado, e aumentava o número de animais mortos (Fig. 7 e 8).



Figura 7 – Animal com baixa condição corporal, apatia e com mau estado geral.



Figura 8 – Animal *post mortem* com magreza acentuada.

2.4. Provas realizadas para a confirmação do diagnóstico

O diagnóstico inicial foi baseado na diminuição da produção de leite associada a elevada mortalidade, principalmente no grupo das Floridas, juntamente com a realização de necropsias aos animais mortos. Perante o quadro lesional observado e na ausência de diagnóstico definitivo, optou-se por enviar amostras de pulmão para laboratório, tendo-se vindo a confirmar a presença de micobactérias e lesões compatíveis com tuberculose (Tabela 7). Após a confirmação, o caso foi notificado às autoridades oficiais.

Tabela 7 – Descrição das amostras enviadas para laboratório antes da IDTB simples.

Data envio amostra	Análise	Resultado	Comentário
18 de outubro de 2012	Coloração com método de Auramina (corante alternativo à fucsina utilizada no ZN).	Presença de micobactérias.	Pulmão com avançado estado de autólise. Presença de nódulo com 1 cm de diâmetro, rodeado por outros nódulos de tamanho inferior e com conteúdo caseoso.
30 de outubro de 2012	Histopatologia	Lesões compatíveis com tuberculose pulmonar.	Lesões granulomatosas cujos granulomas apresentam necrose caseo-calcária, reação inflamatória envolvente por células epitelióides, macrófagos, linfócitos e células gigantes. Foram identificados bacilos pelo método ZN.
29 de Novembro de 2012	Bacteriologia	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Enterobacter sp</i> ; <i>Pasteurella haemolytica</i> e <i>multocida</i> ; <i>Streptococcus sp</i> .	Não foram identificadas micobactérias nem lesões compatíveis com tuberculose.
3 de Dezembro de 2012	Anatomopatológica	Presença de lesões	Cadáver com emaciação; Presença de formações nodulares salientes na superfície da pleura, que ao corte apresentavam material necropurulento.
3 de Dezembro de 2012	Histopatológica	Presença de lesões e BAAR	Pulmão: Focos de necrose com limites irregulares, com perda de tecido pulmonar na parte central e formação de locas que estavam envolvidas por uma intensa reação celular, na qual predominavam os neutrófilos, os macrófagos e as células mononucleares mais periféricamente. Pelo método de ZN observaram-se inúmeros aglomerados de BAAR.

2.5. Prova da Intradermotuberculinização Simples

A execução da IDTB simples foi levada a cabo por uma equipa composta por quatro elementos da DIV – Évora, dois deles realizaram a prova propriamente dita e os outros dois apontaram a identificação do animal, o sexo e as medidas da prega de pele em mm. A prova foi realizada em dois dias, o primeiro dia 30 de novembro de 2012 e o segundo dia 3 de dezembro de 2012.

A prova foi realizada com a seguinte metodologia: corte dos pêlos na zona de injeção, com o uso de uma tesoura, numa superfície de aproximadamente 5 cm², pele limpa e ausente de lesões/tumefações; medição da prega de pele com auxílio de cutímetro e segurando a mesma entre o polegar e o indicador; e injetou-se a tuberculina (PPD – bovina) na dose de 2000 UI e no volume de 0.1 ml, após a qual verificou-se se a inoculação tinha sido correta, mediante a palpação de uma bolha que deve estar presente no local de injeção sempre que esta é feita corretamente. Nos casos em que esta bolha não era sentida procedia-se a nova injeção ligeiramente ao lado da anterior. Para a inoculação da tuberculina recorreu-se a seringas McLintock, cujo o uso requer uma certa experiência já que a pele dos caprinos é mais fina que a dos bovinos e, portanto, é mais fácil que a inoculação fique no tecido subcutâneo ou, até mesmo, intramuscular, o que alteraria os resultados da prova.

A reação de hipersensibilidade tardia ou do tipo IV começa a ser significativa passadas 24 horas desde o contato com o antígeno, contudo o ponto mais alto de reação ocorre passadas 72 horas. Por este motivo e como sucede no programa de erradicação da tuberculose bovina, fez-se a leitura transcorrido este período (3/12/12 e 6/12/12).

No dia da leitura, fez-se novamente a medição da prega de pele com o cutímetro, realizada pela mesma equipa da DIV – Évora que fez as medições e realizou a IDTB simples (fator importante, pois a pressão incutida no cutímetro e consequente valor obtido varia de pessoa para pessoa).

2.6. Exame *post mortem*

Atendendo aos resultados da prova de IDTB simples as entidades responsáveis optaram pelo abate total do efetivo, realizado a 3 de janeiro de 2013, com rejeição de todas as carcaças. Foram abatidos 366 caprinos adultos e 110 cabritos o que perfaz um total de 476 animais.

Os animais entravam na linha de abate de acordo com os procedimentos habituais do matadouro e era realizada identificação e inspeção de todas as carcaças.

2.7. Diagnóstico Histopatológico

Dos animais em que foram observadas lesões ao exame macroscópico, foram recolhidas amostras de 6 animais, escolhidos aleatoriamente, que seguiram para o LNIV/INIAV, onde foi realizado o diagnóstico histopatológico e bacteriológico. As amostras chegaram congeladas, facto que influencia os cortes histológicos e a qualidade das imagens microscópicas.

Após chegarem ao laboratório, as amostras passaram por uma nova inspeção macroscópica, realizada pelos patologistas do laboratório, foram seleccionadas secções do órgão para serem preparadas, realizados cortes e corados por HE e ZN.

2.8. Diagnóstico Bacteriológico

Foram enviadas para o LNIV/INIAV amostras de pulmão e gânglios linfáticos regionais de 6 caprinos com lesões características de tuberculose, escolhidos aleatoriamente no dia do abate, os mesmos que seguiram para o diagnóstico histopatológico.

As amostras frequentemente enviadas para laboratório com suspeita de tuberculose são secções de pulmão ou dos gânglios linfáticos mediastínicos e bronquiais, mas qualquer outro tecido com lesões pode ser enviado. Estas amostras podem ser conservadas e chegar ao laboratório de duas formas, uma delas mergulhadas em formol e a outra refrigeradas ou congeladas.

Após uma primeira inspeção e consequente seleção do fragmento de órgão com lesão característica, faz-se uma descontaminação com soda cáustica 4%, obtendo-se um macerado, a partir do qual será feita a cultura. Para avaliar a eficácia da descontaminação faz-se cultura em placa de agar sangue. Os microrganismos mais frequentemente encontrados são *Bacillus cereus*.

Os procedimentos laboratoriais realizados no LNIV/INIAV vão de encontro aos referenciados na revisão anterior. Assim sendo, faz-se cultura em meio sólido, nos meios Stonebrink e Lowenstein-Jensen com piruvato, em estufa, a uma temperatura de 37°C até 12 semanas (transposto este período a cultura é considerada negativa), e em meio líquido, com auxílio do sistema Bactec 9000 MB que encurtece o tempo de crescimento das bactérias para um máximo de 6 semanas. Este sistema funciona por rotação e permite a obtenção de resultados computadorizados, uma vez que cada tubo de ensaio possui um código de barras que

passa por um leitor à entrada e à saída do sistema, permitindo registrar o número de dias que cada tubo tem de incubação, bem como quais e quantos tubos estão no sistema sem este ser aberto.

Se ocorrer crescimento de culturas em qualquer um dos meios essa cultura segue para o departamento de biologia molecular para ser realizado PCR e testes rápidos comerciais como o INNO-LiPA MYCOBACTERIA e o GenoType MTBC. O INNO-LiPA, baseia-se em sondas de DNA, para utilização *in vitro*, detetando e identificando bactérias do género *mycobacterium* a partir de culturas líquidas e sólidas, baseado em diferenças de nucleótidos na região 16S-23S do RNA ribossomal. Este teste permite identificar várias espécies de micobactérias, mas no caso da tuberculose apenas identifica o MTBC e especifica a espécie, ou seja, o resultado apenas nos indica que estamos perante uma micobactéria do complexo sem nos especificar a espécie. Por sua vez o GenoType MTBC, permite, com base no polimorfismo do gene GyrB, a diferenciação genética das espécies pertencentes ao MTBC.

3. Resultados

3.1. Mortalidade

A taxa de mortalidade variou de grupo para grupo, considerando um grupo as cabras da raça Florida, um segundo grupo as cabras da raça Murciano-granadina e um terceiro grupo os machos (Tabela 8). Analisando o número de animais entre setembro e dezembro observou-se que morreram 17 animais da raça Florida (31,48%), 9 animais, fêmeas, da raça Murciano-granadina (2,77%) e nenhum macho. Considerando o efetivo total, morreram 26 animais (6,63%) em sensivelmente 3 meses.

Tabela 8 – Evolução do número de animais no efetivo entre setembro e dezembro.

Número de animais do efetivo			
	Setembro	Dezembro	Taxa Mortalidade
Floridas	54	37	31,48%
Murciano-Granadinas	325	316	2,77%
Machos	13	13	0%
Efetivo Total	392	366	6,63%

3.2. Prova de Intradermotuberculinização

Os resultados obtidos nesta prova foram 80 animais positivos (21,86), 2 animais duvidosos (0,54%) e os restantes 284 animais (77,6%) foram considerados negativos. Os índices obtidos, ou seja, o incremento da prega de pele entre as duas medições, nos animais positivos, variaram de 4 mm a 28 mm (Fig. 9). Para além desta observação, notou-se também a presença de sinais clínicos como hipertrofia dos gânglios linfáticos pré-escapulares, dor à palpação destes gânglios e presença de escaras no local de inoculação como resultado de destruição do tecido e necrose no local de inoculação (Fig. 10).



Figura 9 – Reação e espessamento da prega de pele de um caprino no dia da leitura.



Figura 10 – Presença de escara no local de injeção no dia da leitura da IDTB.

Dos 329 caprinos da raça Murciano-granadina testados, 46 (13,98%) foram classificados como positivos, 1 (0,30%) como duvidoso e 282 (85,71%) como negativos (Fig. 11).

O grupo das Floridas, composto por 37 animais que foram submetidos à prova de IDTB, apresentou 34 (91,89%) animais positivos, 1 (2,70%) duvidoso e 2 (5,41%) negativos (Fig. 12).

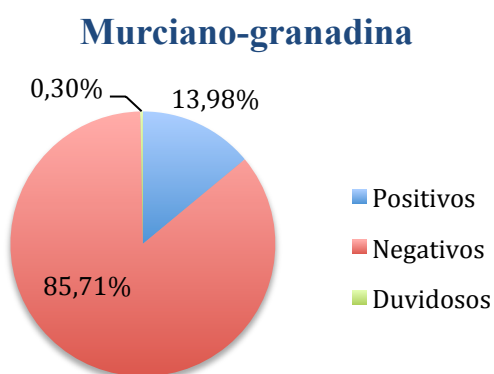


Figura 11 – Resultados da prova de IDTB nos caprinos de raça Murciano-granadina.

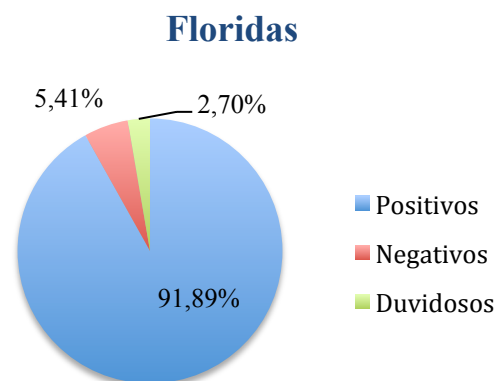


Figura 12 – Resultados da prova de IDTB nos caprinos de raça Florida.

Tendo em conta os resultados da IDTB pode afirmar-se que a prevalência no grupo dos caprinos da raça Murciano-granadina foi de 13,98%, no grupo das Floridas de 91,89% e considerando o rebanho no total a prevalência foi de 21,89%.

3.3. Exame *post mortem*

Analisando o efetivo total, 80 (21,86%) animais foram considerados como positivos e 286 (78,14%) como sendo negativos. Dos 110 cabritos, apenas 3 (2,73%) foram classificados como positivos, um dos quais apresentou uma lesão exuberante num gânglio linfático mediastínico, outro evidenciou granuloma no pulmão e o terceiro apresentou lesões no pulmão, gânglios linfáticos mediastínicos e algumas lesões generalizadas que podem ser ou não resultado de infeção por micobactérias.

Considerando apenas os animais adultos, no grupo dos caprinos da raça Murciano-granadina foram identificados 57 (17,33%) animais com lesões características de tuberculose e 272 (82,67%) animais que não desenvolveram qualquer tipo de lesão visível que fosse sugestiva de tuberculose (Fig. 13). No grupo das Floridas, 23 (62,16%) animais foram considerados positivos e 14 (37,84%) negativos (Fig. 14).

Com base na presença de lesões características de tuberculose pode referir-se uma prevalência de 17,33% no grupo das Murciano-granadinas, de 62,16% no grupo das Floridas e uma prevalência geral de 21,86%.

Murciano-granadinas

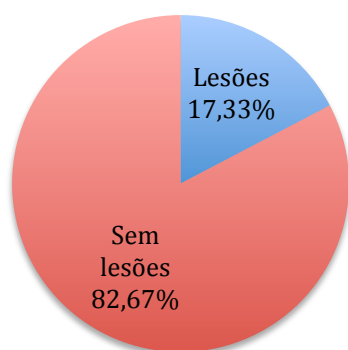


Figura 13 – Percentagem de animais da raça Murciano-granadina que desenvolveram lesões visíveis compatíveis com tuberculose.

Floridas



Figura 14 – Percentagem de animais da raça Florida que desenvolveram lesões visíveis compatíveis com tuberculose.

Avaliando a distribuição das lesões observadas ao exame macroscópico pode-se dividir os resultados da seguinte forma: 22 (27,5%) animais com lesões ao nível dos pulmões e gânglios linfáticos mediastínicos, formando o complexo primário, 43 (53,75%) animais apenas com lesões características no pulmão, 14 (17,5%) animais com lesões no gânglio linfático mediastínico e 1 (1,25%) animal com sinais de generalização, apresentando lesões no fígado (Fig. 15).

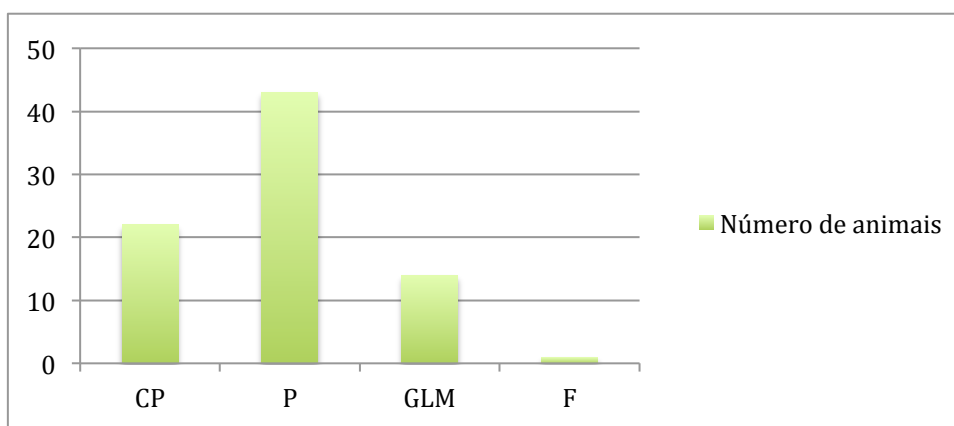


Figura 15 – Distribuição das lesões macroscópicas observadas à necropsia. Complexo Primário (CP); Pulmão (P); Gânglio Linfático Mediastínico (GLM); Fígado (F).

O órgão mais afetado e com maior número de lesões foi o pulmão. As lesões variavam, desde pequenos granulomas, com cerca de 1 cm de diâmetro, (Fig. 16) a granulomas com 4 a 5 cm (Fig. 17) e, num dos casos, atingiu 8 a 9 cm de diâmetro (Fig. 18). Estas lesões eram bem delimitadas, com cápsula fibrosa espessa e com área de necrose central caseo-calcária que, por vezes, era sentida ao corte (Fig. 19). Para além destas lesões granulomatosas, consideradas primárias, foram também observadas lesões mais graves ou generalizadas de carácter exsudativo, como lesões cavitárias com presença de algum material caseoso, de coloração branco-amarelada, no seu interior e perda dos contornos dos tecidos em redor (Fig. 20).



Figura 16 – Lesões anatomo-patológicas: Múltiplos granulomas individualizados no parênquima pulmonar.

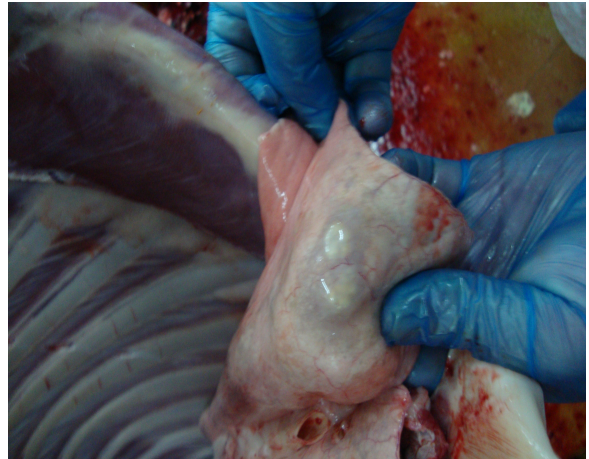


Figura 17 – Lesão anatomo-patológica: Granuloma tuberculoso presente no pulmão.

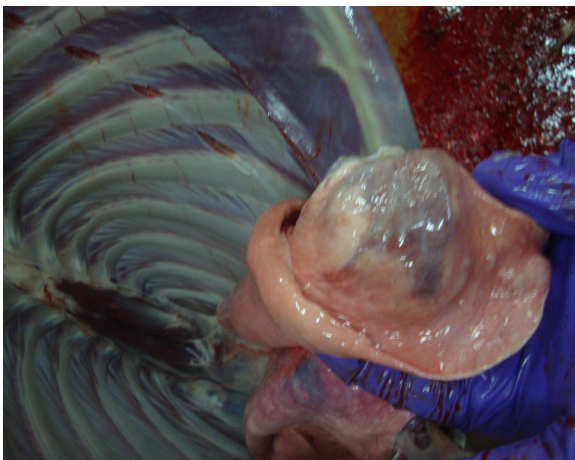


Figura 18 – Lesão anatomo-patológica: Lesão exuberante no pulmão de um caprino.



Figura 19 – Lesão anatomo-patológica: Necrose caseo-calcária ao corte de um granuloma tuberculoso.



Figura 20 – Lesão anatomo-patológica: Lesão cavitária no pulmão de um caprino.

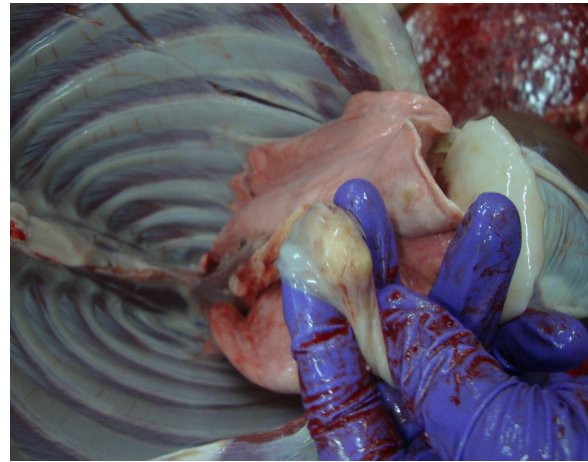


Figura 21 – Lesão anatomo-patológica: Granuloma tuberculoso num gânglio linfático mediastínico.

Nos gânglios linfáticos foram igualmente encontrados granulomas individualizados e encapsulados, mas em menor número que nos pulmões (Fig. 21 e 22). Na maioria dos casos as lesões eram de pequenas dimensões, multifocais, compostas por material caseoso e calcificado. No entanto, em alguns animais afetavam todo o órgão, apresentando-se frequentemente como coleções de material caseoso e pouco calcificado.

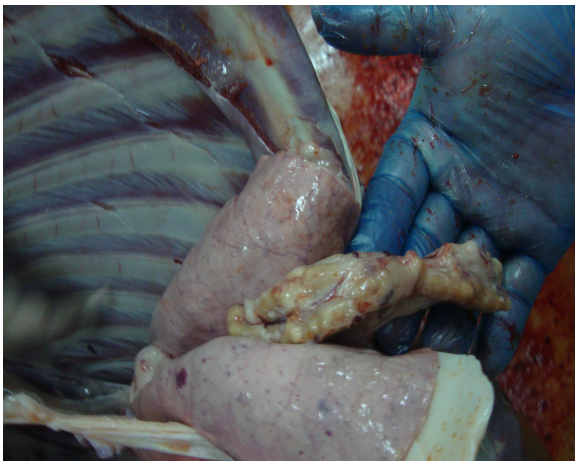


Figura 22 – Lesões anatomo-patológicas: Múltiplos granulomas de tuberculose nos gânglios linfáticos mediastínicos.



Figura 23 – Lesões anatomo-patológicas: Focos de tuberculose miliar no fígado.

Um dos caprinos inspecionados apresentava focos de tuberculose miliar no fígado, como resultado da generalização do processo, com cerca de 2 cm de diâmetro, pouco encapsulados e localizados na membrana serosa do órgão (Fig. 23).

3.4. Diagnóstico Histopatológico

Dos 6 animais que foram recolhidas amostras, todos apresentaram lesões microscópicas compatíveis com tuberculose (Tabela 9; Fig. 24, 25, 26, 27, 28 e 29) e em 4 deles foram identificados BAAR (Fig. 30).

Tabela 9 – Descrição das lesões microscópicas de tuberculose observadas nas amostras dos 6 animais.

Animal	IDTB	Bacteriologia	Histopatologia	
			ZN	HE
<u>Animal 1</u>	Incremento de 14 mm da prega de pele – Positivo ao teste.	Positivo	Presença de bacilos	Extensas lesões de tuberculose caseocalcária no pulmão e gânglios linfáticos regionais.
<u>Animal 2</u>	Incremento de 18 mm da prega de pele – Animal positivo ao teste.	Positivo	Sem identificação de bacilos	Lesões multifocais de tuberculose caseocalcária no pulmão.
<u>Animal 3</u>	Ausência de reação – Animal negativo ao teste.	Positivo	Presença de bacilos	Extensas lesões de tuberculose no pulmão. Lesões cavernosas que se estendem até aos brônquios e bronquíolos, com destruição da parede e acumulação de material necrosado no lúmen, constituindo assim “forma aberta” de tuberculose.
<u>Animal 4</u>	Incremento de 8 mm da prega de pele – Animal positivo ao teste.	Negativo	Sem identificação de bacilos	Pulmão com focos de necrose purulenta envolvidos por células mononucleares que se estendem por vezes ao longo dos bronquíolos.
<u>Animal 5</u>	Ausência de reação – Animal negativo ao teste.	Negativo	Presença de bacilos	Lesão granulomatosa no pulmão com centro necrótico envolvido por intensa infiltração, células mononucleares e algumas células gigantes.
<u>Animal 6</u>	Incremento de 13 mm da prega de pele – Animal positivo ao teste.	Positivo	Presença de bacilos	Pulmão com extensas lesões de tuberculose caseocalcária, com necrose central e formação de cavernas com extensos aglomerados de bacilos. Gânglio linfático regional com lesões caseocalcárias que preenchiam a quase totalidade do órgão.

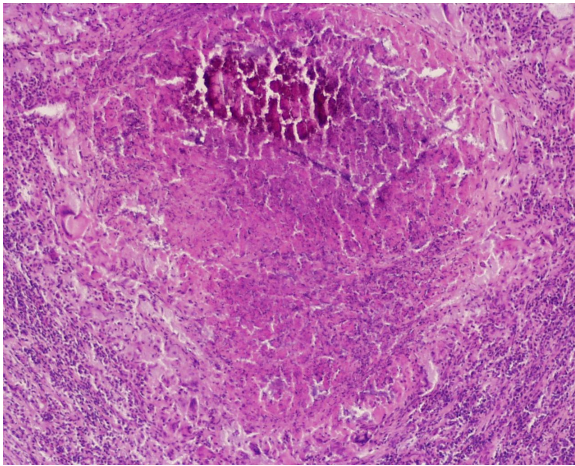


Figura 24 – Corte histológico de Gânglio linfático - Granuloma com necrose e calcificação central; na periferia visualizam-se algumas células gigantes de Langhans; HE; Oc. 10x; Obj. 10x (Fotografia cedida pelo Laboratório de Patologia/LNIV Lisboa).

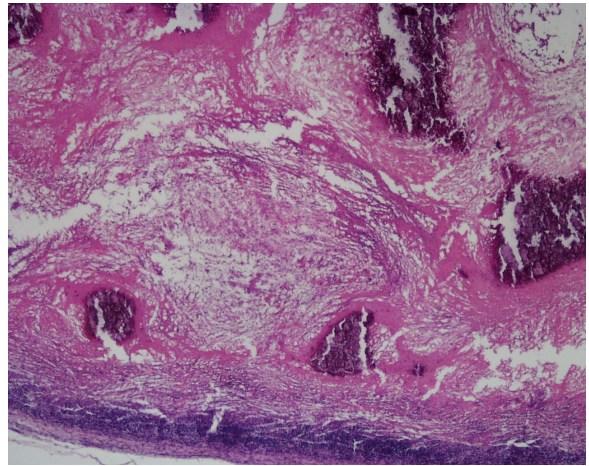


Figura 25 – Corte histológico de Gânglio linfático - Extensas zonas de necrose de caseificação e focos de mineralização; HE; Oc.10 x; Obj. 4x (Fotografia cedida pelo Laboratório de Patologia/LNIV Lisboa).

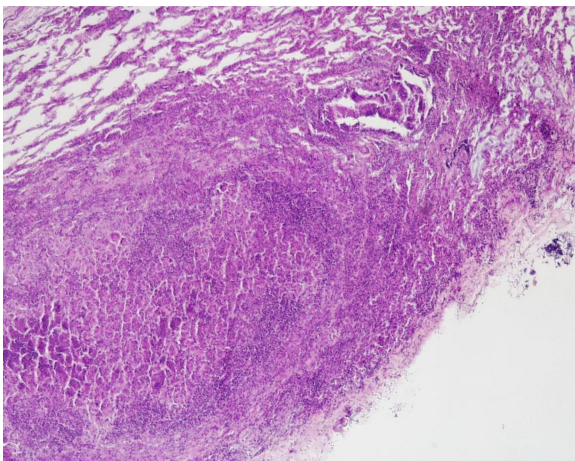


Figura 26 – Corte histológico de Pulmão - Granuloma com necrose central envolvido por macrófagos, alguns multinucleados; HE; Oc. 10x; Obj. 4x (Fotografia cedida pelo Laboratório de Patologia/LNIV Lisboa).

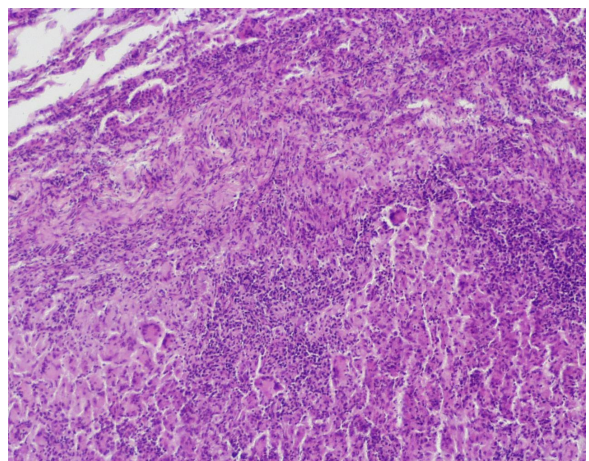


Figura 27 – Corte histológico de Pulmão - Periferia do granuloma com células gigantes e numerosos linfócitos; HE; Oc. 10x; Obj. 10x (Fotografia cedida pelo Laboratório de Patologia/LNIV Lisboa).

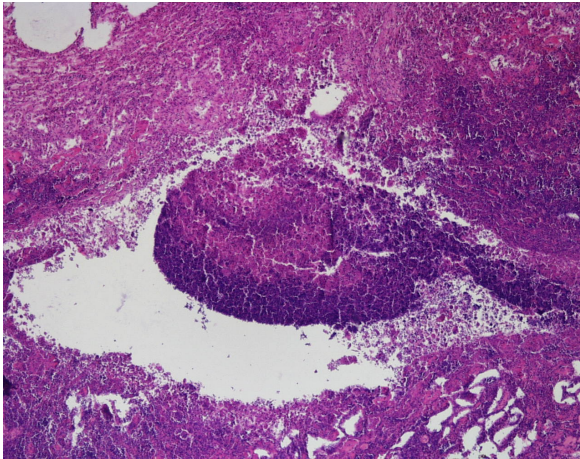


Figura 28 – Corte histológico de Pulmão - Foco de necrose com formação de caverna; HE; Oc. 10x; Obj. 4x (Fotografia cedida pelo Laboratório de Patologia/LNIV Lisboa).

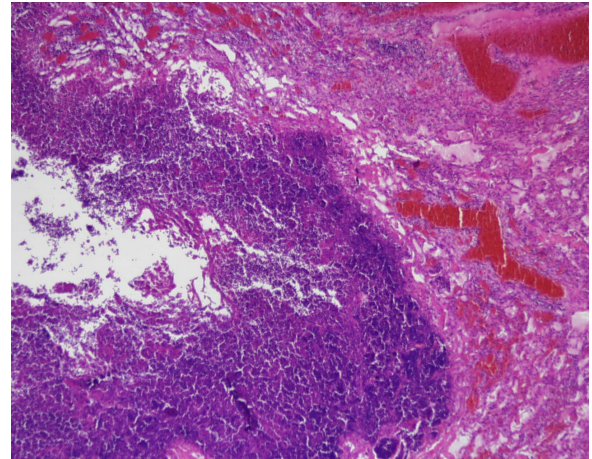


Figura 29 – Corte histológico de Pulmão - Parede de lesão cavernosa; HE; Oc. 10x; Obj. 4x (Fotografia cedida pelo Laboratório de Patologia/LNIV Lisboa).

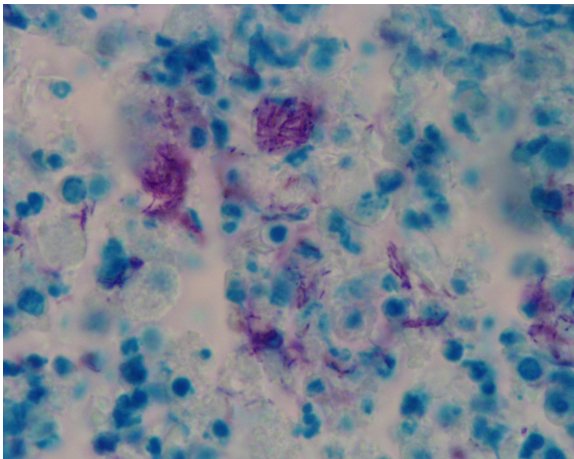


Figura 30 – Corte histopatológico de Pulmão: Bacilos ácido-álcool-resistentes (BAAR), em aglomerados, no interior duma lesão cavernosa; ZN; Oc. 10x e Obj. 40x (Fotografia cedida pelo Laboratório de Patologia/LNIV Lisboa).

3.5. Diagnóstico Bacteriológico

Das culturas realizadas, apenas cresceram colónias em 4 dos 6 animais analisados (Tabela 9), as quais foram utilizadas para a realização do diagnóstico molecular, recorrendo aos testes rápidos mencionados anteriormente, dando origem a resultados compatíveis com *M. caprae* em ambas as culturas.

3.6. Sensibilidade e Especificidade da prova de IDTB

Considerando os animais com lesões macroscópicas visíveis características de tuberculose aquando da inspeção *post mortem* como doentes e como não doentes os animais que não apresentaram lesões macroscópicas visíveis, pode dizer-se que a prova de IDTB resultou em 39 animais falsos positivos e 38 falsos negativos (Tabela 10).

Tabela 10 – Dados auxiliares para estudo da sensibilidade e especificidade.

	Lesões Positivas	Lesões Negativas
IDTB simples Positiva	VP (41)	FP (39)
IDTB simples Negativa	FN (38)	VN (246)

Sabendo que um resultado positivo no teste pode significar que o animal está realmente doente (VP – Verdadeiro Positivo) ou não está doente (FP – Falso Positivo) e que um resultado negativo pode significar que efetivamente o animal não está doente (VN – Verdadeiro Negativo) como pode estar doente e não reagir (FN – Falso Negativo), pode calcular-se a sensibilidade de um determinado teste pela seguinte fórmula, $VP/(VP+FN)$. Tendo em conta os valores da Tabela 10, neste estudo a sensibilidade da prova de IDTB simples, sempre assumindo que os animais com lesões eram positivos, foi de 35,04%. Já a especificidade que é facultada pela fórmula, $VN/(VN+FP)$, neste estudo foi de 86,32%.

4. Discussão

Neste estudo verificou-se que a tuberculose é muitas vezes uma doença com evolução subclínica, destacando-se a elevada mortalidade como um dos principais sinais, mas sendo este um sinal comum a várias patologias, torna-se também inconclusivo. No entanto, estes cadáveres são úteis para a recolha de amostras e posterior realização de testes confirmativos de diagnóstico.

4.1. Resultados obtidos na prova de intradermotuberculinização simples

A prova oficial e usada por rotina no diagnóstico da tuberculose bovina em Portugal é a prova de IDTB comparada, no entanto a DIV – Évora optou pela realização da IDTB simples por vários motivos. O quadro clínico, as lesões compatíveis com tuberculose, a presença de micobactérias nas amostras enviadas para laboratório, a origem dos animais, a ausência de vacinação contra a paratuberculose, a simplicidade da realização da prova e até fatores económicos contribuíram para essa decisão. Segundo García Marín (2010), a IDTB simples deve ser opção em rebanhos com tuberculose demonstrada (necropsia, cultivo, PCR) e que não estão vacinados para a paratuberculose, e a IDTB comparada em rebanhos vacinados, com percentagens de positividade baixas e com reações pouco evidentes na IDTB simples, tuberculose não demonstrada e em casos de paratuberculose diagnosticada.

Dependendo dos resultados obtidos na prova de IDTB e da presença ou ausência de lesões macroscópicas visíveis aquando da inspeção *post mortem*, pode relacionar-se estes resultados de diferentes modos.

Os resultados de sensibilidade e especificidade da IDTB obtidos foram abaixo dos valores apresentados por outros autores: 68 a 95% de sensibilidade e 96 a 99% de especificidade (Monaghan *et al.*, 1994); 83 a 100% de sensibilidade e 81 a 100% de especificidade (García Marín, 2010); 85% de sensibilidade e 98% de especificidade (Vergara & Delgado, 2011); 53,2 a 71% de sensibilidade e 97,6 a 99,2% de especificidade (Bezós *et al.*, 2012). Existem inúmeros fatores que contribuem para o aparecimento de falsos positivos e falsos negativos, sendo que os falsos positivos vão interferir nos valores de especificidade e os falsos negativos nos valores de sensibilidade da prova em questão.

Contribuem para o aparecimento de falsos positivos os seguintes aspetos: presença de outras infeções causadas por micobactérias, tais como, a paratuberculose que é muito

frequente nos pequenos ruminantes; rebanhos vacinados contra a paratuberculose; intervalo entre duas provas de tuberculina inferior a 60 dias (Aranaz *et al.*, 2006); presença de micobactérias ambientais (García Marín, 2010); reações cruzadas com *Nocardia (faracinicus)* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsável pela linfadenite caseosa (Bezós *et al.*, 2012; Radostitis *et al.*, 2002; Lilenbaum, 2000); prova de diagnóstico realizada por técnicos diferentes e inspeção sanitária realizada por inspetores diferentes (Monaghan *et al.*, 1994). Podem ainda ocorrer em animais que já tiveram em contato com micobactérias do MTBC e cujo sistema imunitário controlou a infeção, designando-se este facto de estado de latência (Garrido, 2011).

No caso deste estudo, como a sensibilidade e especificidade da prova foram calculadas considerando a presença de lesões na necropsia, podemos acrescentar ainda a presença de lesões em órgãos incomuns, uma vez que o exame é geralmente direccionado para os órgãos com maior probabilidade de conter bacilos (gânglios linfáticos mediastínicos, brônquicos e mesentéricos, pulmão e glândula mamária), a possibilidade de existirem lesões muito pequenas que correspondem a infeções iniciais que não são visíveis durante a inspeção, e a falta de especificidade da IDTB simples, não sendo capaz de diferenciar micobactérias do MTBC de outras micobactérias.

Segundo García Marín (2010), uma exploração com níveis elevados de positividade à IDTB simples (>20%) e com incrementos cutâneos muito evidentes, não se deve pensar em reações cruzadas por micobactérias do complexo *Mycobacterium avium*, pois nesses casos as reações são muito débeis e resultam em muitos animais duvidosos.

No caso apresentado, pode-se falar em níveis de positividade de 21,89%, podendo deduzir-se que nesta exploração a probabilidade de ter uma infeção mista tuberculose/paratuberculose é baixa.

Para o incremento de falsos negativos podemos considerar: fases iniciais de infeção, com lesões mínimas que ainda não desenvolveram resposta imune suficiente; lesões crónicas exudativas e cavitárias que apresentam pouca resposta imune celular (animais anérgicos) (García Marín, 2010); a dose de tuberculina injetada; animais infetados ou vacinados para a paratuberculose; dessensibilização durante o teste de tuberculina ou o pós-parto (30% são falsos negativos); animais velhos; (Radostitis *et al.*, 2002); prova de diagnóstico realizada por técnicos diferentes e inspeção sanitária realizada por inspetores diferentes (Monaghan *et al.*, 1994). No presente estudo, podemos também considerar o intervalo de tempo entre a prova

de IDTB e o abate dos animais, cerca de um mês, para explicar a ocorrência de falsos negativos nesta prova.

O teste IFN- γ é, também, uma prova oficial no diagnóstico da tuberculose, realizada *in vitro*, e constitui uma alternativa à prova da tuberculina, que para além de conseguir detetar animais positivos numa fase mais precoce de infeção, tem demonstrado uma sensibilidade superior e o manejo dos animais é feito com uma única intervenção. No entanto, o IFN- γ tem algumas limitações, como a baixa especificidade em determinadas circunstâncias, custos elevados e inúmeras questões logísticas (Bezós *et al.*, 2012). Tal como acontece com a IDTB os valores de sensibilidade e especificidade variam de autor para autor: sensibilidade de 71 a 87,2% e especificidade de 96,4 a 98,4% (Bezós *et al.*, 2012); sensibilidade de 83 a 92% e especificidade de 96 a 100% (García Marín, 2010).

Como referido anteriormente, a prova de IDTB simples é influenciada em função da extensão das lesões presentes, assim sendo, o teste IFN- γ incrementa a sensibilidade nos animais com lesões mínimas em 5,4% e em 11,2% nos animais com lesões extensas, como é o caso das cabras com lesões cavitárias (García Marín, 2010).

Outro teste que pode ser utilizado para o diagnóstico em vida e aumentar a eficácia de diagnóstico é o teste Elisa que deteta os animais doentes com base em resposta humoral, sendo muito fiável na detecção de cabras anérgicas. O teste standart, apresenta baixa sensibilidade (50 a 60% (García Marín, 2010); 54,9% (Gutiérrez *et al.*, 1998)) e especificidade moderada (80% (García Marín, 2010); 88% (Gutiérrez *et al.*, 1998)), comparativamente aos testes baseados na resposta imunitária celular (IDTB e IFN- γ) (García Marín, 2010). O teste Elisa anamnésica, realizado 15 a 25 dias depois da IDTB, dispõe uma sensibilidade e especificidade mais elevadas (88,6% e 95,8%, respetivamente) (Gutiérrez *et al.*, 1998).

É de extrema utilidade a realização de provas em simultâneo com a IDTB para aumentar a sensibilidade do teste. O IFN- γ apresenta uma concordância elevada com a IDTB (>90%), pelo que deve ser utilizado em situações muito específicas como nos casos em que ocorrem muitos positivos com reações ténues e duvidosas e quando é necessário realizar vários testes em curtos espaços de tempo, uma vez que este teste não necessita de período de dessensibilização, pois a interação com o antígeno é feita *in vitro* e não é necessário injetar no animal. Dado os custos do IFN- γ e sabendo do grau de concordância com a IDTB, a opção por testes sorológicos como o Elisa, realizado aos animais negativos à IDTB, como vimos ao longo deste trabalho podem ser os mais contagiosos (lesões crónicas sem resposta celular),

pode aumentar a eficácia do diagnóstico. Segundo Gutiérrez e colaboradores (1998), o Elisa pode atingir sensibilidade de 100% em caprinos com lesões muito graves.

Os dados apresentados e recolhidos, da prova de IDTB, a prevalência de doença nos 2 grupos, as lesões que demonstraram no abate e a percentagem de animais mortos, sugerem que a fonte da infeção de tuberculose foi o grupo das Floridas. Não obstante a possibilidade de o grupo das Murciano-granadinas também já estar infetado antes da entrada na exploração. Nesta situação as técnicas de diagnóstico molecular tinham sido uma mais valia para identificar a estirpe ou estirpes presentes na população, não só para determinar se existiam várias estirpes na população, mas também para saber se esta estirpe já havia sido isolada em Portugal. Segundo Duarte e colaboradores (2007) o sentido da transmissão entre dois animais é difícil de apurar visto a tuberculose ter um período de incubação longo, com quadros pouco uniformes e uma evolução arrastada.

As provas de IDTB não são 100% específicas o que pode resultar em falsos positivos e deste modo levar ao sacrifício desnecessário de animais, colocando em questão a credibilidade dos programas de erradicação. No entanto, em rebanhos com elevada prevalência de infeção as provas de IDTB tem-se mostrado bastante fidedignas.

A IDTB simples neste estudo mostrou-se um recurso viável para determinar a presença de tuberculose no rebanho com uma prevalência elevada, no entanto em casos pontuais pode não ser suficiente, pois a sensibilidade é baixa.

4.2. Lesões macroscópicas observadas

A realização do exame anatomo-patológico é bastante útil para o diagnóstico da tuberculose, visto que as lesões quando presentes são muito características e sugestivas desta infeção. Para além disso, permite obter resultados em tempo real.

Neste estudo observou-se a presença de lesões difusas e exsudativas que demonstram o elevado grau de disseminação da doença no rebanho, bem como lesões calcificadas que demonstram o carácter crónico da infeção.

A idade e o sistema de produção influencia o desenrolar da doença. Em geral, os animais que se infetam quando são jovens desenvolvem lesões mais severas que os adultos e a sua ocorrência é mais frequente em sistemas de produção intensiva, devido ao facto dos animais estarem confinados e com sobrelotação (Garrido, 2011).

Dependendo do modo de transmissão, da localização da lesão e do quadro lesional, a infecção por micobactérias do MTBC pode ser dividida em diferentes fases: primária e pós-primária.

É definida como tuberculose primária a lesão inicial que corresponde à porta de entrada do bacilo, geralmente está presente no pulmão, e dá lugar à formação de um granuloma característico. Pode ocorrer evolução do processo e os macrófagos contaminados contendo micobactérias podem disseminar a infecção para os gânglios linfáticos regionais formando o complexo primário, que corresponde ao conjunto de lesão no órgão de entrada com o gânglio linfático satélite. A partir desta fase pode ocorrer regressão das lesões no pulmão ou outro órgão inicial e apenas observar-se lesões no gânglio linfático ou a resposta imunitária pode ser rápida e eficaz, impedindo a disseminação para o gânglio linfático associado observando apenas a lesão a nível pulmonar. Pode ocorrer, também, generalização do processo com disseminação do bacilo por via linfática, hematogena ou diretamente, como frequentemente acontece entre o pulmão e a pleura.

Sabendo que a localização das lesões é indicativa da via de infecção, concluiu-se, com base nos resultados obtidos neste estudo, que a infecção por via aerógena terá ocorrido na totalidade dos animais que desenvolveram lesões visíveis e, como acontece em outros estudos (Biet *et al.*, 2005), confirmou-se que esta é a principal via de infecção.

4.3. Lesões microscópicas observadas e diagnóstico bacteriológico

O estudo histopatológico tem grande utilidade para o diagnóstico da tuberculose. As lesões são bastante características, a técnica de preparação e a visualização das lesões, juntamente, com a identificação do bacilo pelo método de ZN é relativamente simples e em termos monetários acessível. Mesmo assim, existe variabilidade de lesões dependendo da severidade e do estado da infecção.

As lesões microscópicas observadas foram idênticas às descritas na bibliografia consultada (García Marín, 2010; Bernabé *et al.*, 1991a). Foram observadas lesões típicas de fases iniciais de doença, nomeadamente o granuloma de tuberculose, com uma área central de necrose com focos de calcificação, rodeada na sua maioria por células inflamatórias mononucleadas e mais externamente por células gigantes de Langhans.

É de salientar a presença de lesões cavernosas que estavam em comunicação com os bronquíolos, constituindo formas abertas de tuberculose. Em alguns casos foram visualizados múltiplos focos secundários de necrose, como resultado da disseminação e extensão das lesões no próprio órgão, muitas vezes preenchendo quase a totalidade do órgão.

Quanto à visualização de BAAR pelo método de coloração ZN, foi possível identificar bacilos em 4 dos animais. Nos restantes 2 animais, apesar de não terem sido visualizados bacilos, podem estar presentes em outras lesões ou cortes de outras partes do órgão.

As lesões iniciais ou primárias da tuberculose são do tipo proliferativo e, por isso, possuem pequenas cargas de bacilos, estando estes localizados centralmente na lesão e rodeados por células inflamatórias. Pelo contrário as lesões cavitárias, ou seja, nas lesões de carácter exsudativo com zonas de maior necrose de caseificação, formando um meio óptimo para o desenvolvimento bacteriano, pode observar-se a presença de inúmeros aglomerados de BAAR.

Analisando os resultados da bacteriologia em paralelo com os resultados obtidos no estudo histopatológico das lesões, podemos constatar que todos os animais apresentaram lesões histopatológicas compatíveis com tuberculose e que dos dois animais negativos ao exame bacteriológico, um apresentou bacilos pelo método ZN e o outro não. Existem alguns fatores que podem ter estado na origem destes dois resultados negativos, tais como: um processo de descontaminação demasiado eficaz com destruição dos microrganismos presentes, incluindo as micobactérias; o fragmento selecionado pode não conter micobactérias viáveis; processos de conservação, armazenamento e transporte de amostras inadequados e em menor percentagem, mas de considerar, falha humana e dos equipamentos utilizados.

4.4. Riscos da exploração em estudo

Económicos: Perante um foco de tuberculose desta dimensão as perdas económicas são inúmeras e abarcam uma cadeia desde o produtor até ao consumidor final. O produtor é invariavelmente o mais afetado ao deixar de produzir leite, ao abater todos os animais do efetivo sem a sua carcaça ser valorizada e ao facto de obedecer a um período de vazio sanitário de 6 meses até introduzir novos animais na exploração. Para além disso, o transporte

de animais e de leite diminui, afetando a cadeia de transportes, e existe uma quebra na produção e, conseqüentemente, na venda de queijo de cabra.

Zoonóticos: A característica zoonótica da tuberculose é dos principais fatores de risco, se não o mais importante, desta doença. Como tal, esta exploração também contribuía ou poderia vir a contribuir para a disseminação da tuberculose.

A exploração possuía 2 empregados que todos os dias alimentavam e ordenhavam os animais, o produtor também dispensava muito tempo ao manejo da exploração e o veterinário responsável pela clínica e sanidade da exploração, estavam expostos à infecção. Outro dado relevante para este ponto, é a presença assídua na exploração de duas crianças que passavam algum tempo com os animais e não possuem os cuidados necessários, quer em termos de higiene e medidas de prevenção básicas, quer em termos dos perigos a que estão expostas, comparativamente aos adultos.

Os indivíduos que realizavam o abate destes caprinos infetados e a manipulação do leite proveniente desta exploração também estavam expostos à infecção e os caprinos com lesões recentes não visíveis macroscopicamente em matadouro, com conseqüente aprovação da carcaça, seguem para a cadeia alimentar, constituindo um perigo para a saúde pública.

A permanência da venda de leite dos animais que obtiveram resultado negativo à IDTB simples, sabendo a probabilidade de ocorrência de falsos negativos nesta prova.

Ambientais: Sabendo a capacidade de sobrevivência das micobactérias no meio ambiente e objetos inanimados, o estrume e a venda deste, constitui um perigo para os indivíduos que fazem o manejo e todo o procedimento de limpeza, bem como para o destinatário final.

Já no local de deposição pode contribuir para a disseminação da doença para animais domésticos, se este os possuir, para animais selvagens que possam estar em contato com este material e até para os proprietários.

Quanto ao pasto a que os animais por vezes tinham acesso, apesar de estar vedado, facilmente é transposto por javalis ou outros animais selvagens.

Disseminação: A relação densidade populacional/dimensão da exploração observada nas explorações com produção intensiva proporciona o ambiente ideal para a propagação da infecção.

A presença dos gatos e do cão, que apesar de não terem sido encontrados casos de tuberculose de origem caprina descritos nestas espécies, têm de ser consideradas como possíveis hospedeiros.

4.5. Limitações deste estudo

Apesar de o valor da amostra (366 animais) ser considerável, o estudo foi realizado apenas numa exploração isolada, pelos mesmos operadores, mesma espécie de animais, o número de falsos positivos e falsos negativos foi elevado comparativamente com outros estudos e não foi realizado outro teste complementar de confirmação.

A inspeção das lesões macroscópicas foi feita em matadouro, na linha de abate, com os animais em movimento o que impediu a visualização pormenorizada das lesões e a diferenciação entre lesões mais antigas (cavitárias e exsudativas) de lesões mais recentes (granulomas individualizados).

Intervalo de tempo de cerca de um mês entre a IDTB e o abate.

IV. Conclusões

Em inúmeros estudos consultados é feita a referência ao facto de os caprinos terem sido considerados, até recentemente, como resistentes ou menos sensíveis à tuberculose (Melo *et al.*, 2012). Esta situação tem sido um entrave ao estudo da tuberculose nesta espécie, num passado recente, bem como uma das razões pela qual não existem planos de erradicação para os caprinos na maioria dos países.

Com este estudo comprovou-se que os caprinos são altamente sensíveis à tuberculose, desenvolvendo lesões cavernosas que comunicam com os bronquíolos, originando formas abertas de tuberculose, que promovem a disseminação da doença e constituem um fator importante para efeitos epidemiológicos.

Em Portugal, a tuberculose caprina é uma realidade que tem ganho importância com a importação de caprinos de Espanha, país que tem elevados índices de incidência de infeção. A inclusão destes animais no nosso país leva à propagação da doença com transmissão de tuberculose aos caprinos de raças autóctones portuguesas, bovinos e animais silváticos, contribuindo num futuro próximo para a classificação de país endémico de tuberculose de origem caprina.

A tuberculose é uma doença com elevado impacto para a saúde pública, o que faz com que a sua erradicação seja cada vez mais um problema da responsabilidade de todos. Para garantir a competitividade das explorações e a confiança dos mercados e consumidores, requer a clarificação do programa de erradicação com medidas mais restritas, executadas de forma continuada, com avaliação da realização de vigilância ao nível das explorações e a inclusão de outras espécies que constituem um reservatório e podem ser um obstáculo para a erradicação da tuberculose.

Cada vez mais é necessário uma relação estrita e de confiança entre a DGV, com a legislação e apoio financeiro do programa, os laboratórios que confirmam os diagnósticos e são uma mais valia para a realização de estudos epidemiológicos, o inspetor sanitária que realiza a vigilância a nível do matadouro, o médico veterinário que mantém maior contato com os produtores e faz a vigilância nas explorações e, por fim, com o produtor que gere todo o manejo dos animais, compra, vende e movimenta.

V. Considerações finais

Os últimos dois casos de tuberculose caprina conhecidos e descritos em Portugal, foram em Montemor-o-Novo, apresentado neste trabalho, e em Trás-os-Montes, exposto também como dissertação de mestrado (Quintas, 2009). Analisando a figura 31 podemos constatar que as zonas mais afetadas pela tuberculose bovina são a região do Alentejo e de Trás-os-Montes. Surgem então várias questões: Será que estes dados estão relacionados? Estas estirpes são as mesmas presentes nos bovinos? Os caprinos são um reservatório para os bovinos em Portugal?

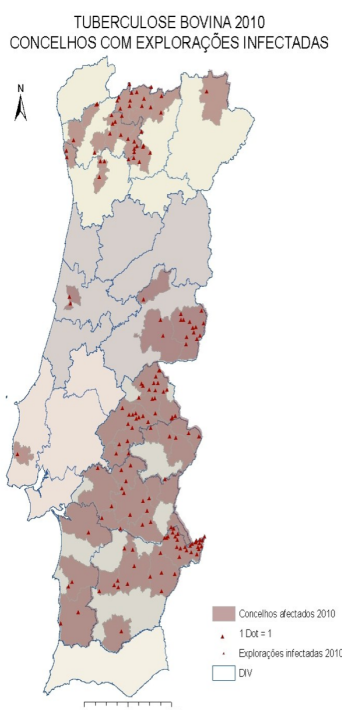


Figura 31 – Distribuição geográfica das explorações com animais positivos no rastreio de tuberculose realizado em 2010. Fonte: Fonseca, 2011.

Seria útil estudar a prevalência de tuberculose caprina em Portugal, de modo a saber se é justificável a realização de um plano de erradicação para esta espécie. O orçamento para realizar um plano de erradicação, como rotina em todos os animais de uma dada espécie é elevado, mas o esquema praticado em Espanha poderá ser uma solução, ou seja, a intervenção em todos os caprinos que sejam mantidos em contato com os bovinos.

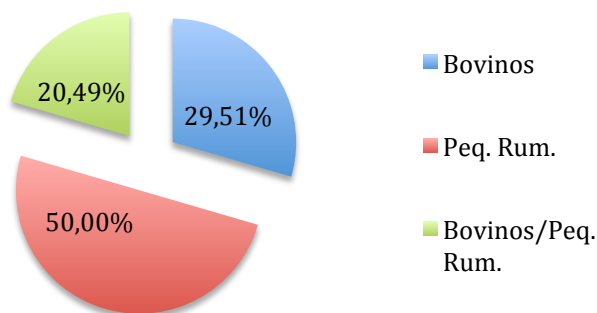


Figura 32 – Distribuição dos clientes de uma clínica veterinária na região de Montemor-o-Novo.

Na figura 32 estão representados os 288 clientes, de Ruminantes, de uma clínica veterinária na região do Alentejo e a espécie de animais que produzem. A percentagem de clientes que produz apenas bovinos é de 29,51%, os que produzem só pequenos ruminantes representam 50% e os clientes que produzem ambas as espécies simultaneamente 20,49%. Com base nestes valores repara-se que a percentagem de pequenos ruminantes a co-habitarem com bovinos é relevante. Como se sabe e já foi referenciado neste trabalho, se os caprinos forem mantidos em contato com bovinos infetados a incidência da doença poderá atingir os 70%. Sabe-se também que a transmissão entre caprinos e bovinos ocorre e que no plano nacional de erradicação da tuberculose apenas consta a espécie bovina. Este facto pode estar a contribuir para que a tuberculose continue a ser uma doença endémica em Portugal.

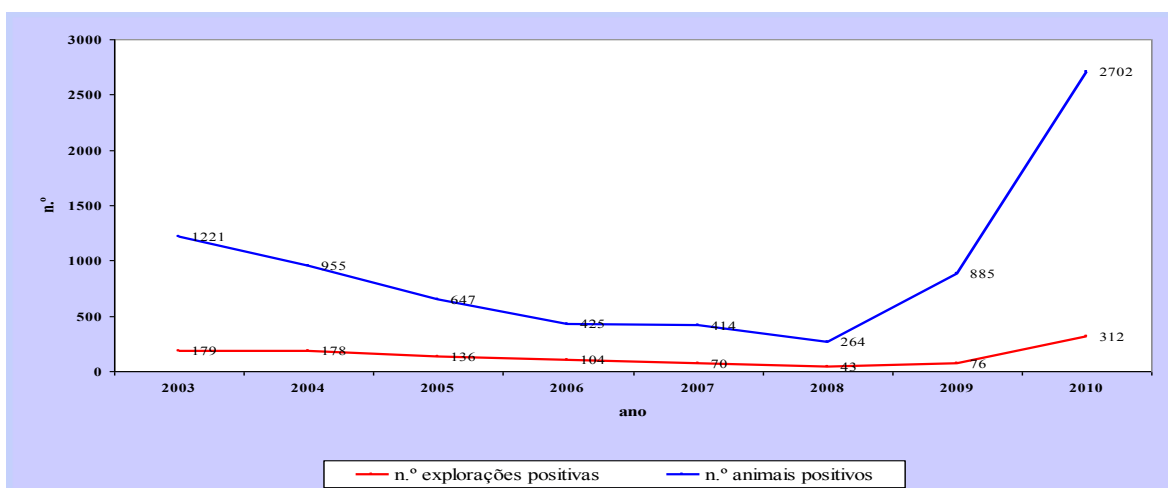


Figura 33 – Evolução dos indicadores de tuberculose bovina entre 2003 e 2010. Fonte: Fonseca, 2011.

Entre 2003 e 2008 ocorreu uma evolução favorável dos níveis de infeção de tuberculose na espécie bovina em Portugal, no entanto não ocorreu erradicação do agente e em 2010 atingiram-se valores muito superiores aos obtidos em 2008. Estes resultados podem ser sugestivos de que o agente responsável pela tuberculose bovina em Portugal não está restrito a esta espécie, que é necessário atender mais aos pormenores e que a presença de animais anérgicos, não detetados pela IDTB, que re-emergiram pode ser alta.

Políticas de controlo sustentável só podem ser alcançadas através de uma melhor compreensão da epidemiologia da tuberculose em conjunto com caprinos, bovinos e reservatório selvagem (Aranaz *et al.*, 2006).

A tuberculose não foi realmente erradicada em nenhum país e existe uma margem considerada como mínima de casos positivos aceites por ano para que esse país mantenha o estatuto de Oficialmente indemne de tuberculose. À medida que um plano de erradicação implementado evolui, torna-se mais difícil o controlo da doença, porque a percentagem de animais que reage ao teste em vida que não apresenta lesões visíveis no abate tende a crescer com a diminuição da prevalência, rebanhos considerados livres podem reincidir sempre com elevada incidência (animal anérgico mantido no rebanho), rebanhos muito grandes mantidos em grandes áreas de extensivo e a falta de controlo sobre o reservatório selvagem (Radostitis *et al.*, 2002).

1. Aspetos que podem ser melhorados no controlo e erradicação da tuberculose

Realização de diferentes métodos complementares de diagnóstico, como exames anatomopatológicos, histopatológicos, bacteriológicos e moleculares, em animais que reagiram à IDTB em vida, podendo desta forma avaliar a sensibilidade e especificidade do teste, determinando assim a utilidade desta prova oficial de diagnóstico no programa nacional de erradicação da tuberculose e em casos de reação isolados.

Realização de Spoligotyping e RFLP com o objetivo de identificar as estirpes presentes nos animais domésticos abatidos, bem como nos animais selvagens abatidos em montarias, ambos com tuberculose diagnosticada, podendo desta forma investigar a relação e origem dos focos de doença.

Campanhas de sensibilização para produtores no sentido de alertar para a construção de vedações adequadas para limitar o contacto com animais selvagens, compra de animais apenas de locais com garantias e com estatuto sanitário conhecido e realização de quarentena após compra ou movimento de animais.

Correlação entre a presença de lesões ou os resultados da IDTB com a idade dos animais. Radostitis e colaboradores (2002), defendem que animais idosos apresentam dificuldade em responder à IDTB.

Formação continua das brigadas de veterinários a campo à cerca da prova de diagnóstico utilizada (IDTB) e dos aspetos epidemiológicos.

As espécies vulneráveis ao *M. caprae* ainda estão pouco estudadas, não estando totalmente clarificadas. Nesta exploração existia um cão e vários gatos, que não sabemos se estão suscetíveis à infeção.

Maior rigor aquando da movimentação, transporte, compra e venda de animais quer a nível nacional quer a nível internacional.

Revisão do plano nacional de erradicação da tuberculose, ponderar a incorporação dos pequenos ruminantes a par do que acontece no plano de erradicação nacional para a brucelose. E avaliação das implicações, neste plano, da coabitação de pequenos ruminantes com bovinos.

Referências Bibliográficas

Alexander, K.A., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., van Helden, P.D, Warren, R.M. & van Pittius, N.C.G. (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. *Emerg. Infect. Dis.*, 16, 1296-1299.

Abalos, P. & Retamal, P. (2004). Tuberculosis: Una Zoonosis Re-emergente?. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 23, 583-594.

Aranaz, A., de Juan, L., Bezos, J., Álvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J.L., *et al.* (2006). Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.*, 37, 593-606.

Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A. & Domínguez, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *Caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1785-1789.

Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., *et al.* (1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *Caprae* subsp. Nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1263-1273.

Atance, P.M. & Vizcaíno, L.L. (1998). La Tuberculosis: Introducción a la Enfermedad. Acedido em 3 de Junho de 2013 em <http://www.secem.es/wp-content/uploads/2013/03/G-10-2-03-Martin-Atance-36-46.pdf>.

Bezós, J., Álvarez, J., Mínguez, O., Marqués, S., Martín, O., Vigo, V., Pieltain, C., *et al.* (2012). Evaluation of specificity of tuberculosis diagnostic assays in caprine flocks under diferente epidemiological situations. *Research in Veterinary Science*, 93, 636-640.

Biet, F., Boschirol, M.L., Thoresl, M.F. & Guilloteau, L.A. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*, 36, 411-436.

Biberstein, E.L. & Hirsh, D.C. (2003). Espécies de *Mycobacterium*: Os agentes da Tuberculose Animal. In: D.C. Hirsh & Y.C. Zee, *Microbiologia Veterinária* (2ª ed., pp. 149-154). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Belknap, E.B. (2002). Diseases of the Respiratory System. In: D.G. Pugh, *Sheep & Goat Medicine* (first ed., pp. 107-128). Philadelphia: Saunders.

Bernabé, A., Gómez, M. A., Navarro, J., A., Gómez, S., Sánchez, J., Sidrach, J., Menchen, V., *et al.* (1991a). Morphopathology of Caprine Tuberculosis I. Pulmonary Tuberculosis. *An. Vet. Murcia*, 6-7, 9-20.

Bernabé, A., Gómez, M.A., Navarro, J.A., Gómez, S., Sánchez, J., Sidrach, J., Menchen, V., *et al.* (1991b). Morphopathology of Caprine Tuberculosis II. Tuberculosis generalization. *An. Vet. Murcia*, 6-7, 21-29.

Cutler, S.J., Fooks, A.R. & van der Pool, W.H.M. (2010). Public Health Threat of New Reemerging and Neglected Zoonoses in the Industrialized World. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 1-7.

Coetzer, J.A.W. & Tustin, R.C. (2004). *Mycobacteria*. In: J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin, *Infectious Diseases of Livestock* (2ª ed., pp. 1965-1994). África do Sul: Oxford.

Cousins, D.V., Batista, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., *et al.* (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53,1305-1314.

Cotran, R.S., Kumar, V. & Collins, T. (1999). Infectious Diseases. In: S.L. Robbins, *Pathologic Basis of disease* (6ªed., pp. 329-403). Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Cousins, D.V., Williams, S.N., Reuter, R., Forshaw, D. Chadwick, B., Coughran, D., Collins, P., et al. (1993). Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. *Aust. Vet. J.*, 70, 92-97.

Cruickshank, R., Duguid, J.P., Marmion, B.P. & Swain, C.H.A. (1975). Mycobacterium. In: R. Cruickshank, J.P. Duguid, B.P. Marmion & C.H.A. Swain, *Microbiologia Médica* (4ªed., pp. 759-769). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Direção Geral de Saúde (2012). *Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose*. Lisboa: Ministério da Saúde.

Direção Geral de Veterinária (2011). *Programa de erradicação da tuberculose bovina 2011*: Portugal. Lisboa: DGV.

Duarte, E. L., Domingos, M., Amado, A., Botelho, A. (2008). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Micobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology*, 130, 415-421.

Duarte, E.L., Domingos, M., Albuquerque, T., Amado, A. & Botelho, A. (2007). Transmissão da tuberculose bovina entre espécies domésticas e silvestres em Portugal: primeiras evidências moleculares em isolados de *Mycobacterium bovis* de uma exploração no Alentejo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102, 299-303.

Direção Geral de Veterinária (2005). *Manual de Procedimentos para a Realização da Prova da Intradermotuberculinização de Comparação (IDC)*. Lisboa: DGV.

European Food Safety Authority (EFSA) (2012). The European Union Summary Reported on Trends and Sources of Zoonosis, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10, 206-221.

Fonseca, A.P. (2011). *Tuberculose bovina em Portugal*. Comunicação apresentada na cadeira de Saúde Pública e Medicina Preventiva, do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Évora, Portugal.

Ferreira, F.A.G. (1967). Tuberculose. In: F.A.G. Ferreira, *Moderna Saúde Pública* (1ªed., pp. 699-702). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Garrido, J.B. (2011). *Tuberculosis caprina: Estudio de la respuesta inmune y aportaciones a su diagnóstico. Tesis Doctoral*. Madrid: Faculdade de Veterinária Universidade Complutense.

García Marín, J.F. (2010). *Tuberculosis Caprina: diagnóstico*. Artículos de Revisión. PR 11, NUM.3: 25-33.

Gutiérrez, M., Tellechea, J., Marín, J.F.G. (1998). Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Veterinary Microbiology*, 62, 281-290.

Gómez, N., Gutiérrez, M.M., Geijo, M.V., García Marín, J.F. (1998). Identificación y Diferenciación de Variantes de *Mycobacterium bovis* en la Tuberculosis Caprina. *Producción Ovina y Caprina*, XXIII, 295-296.

Jubb, Kennedy & Palmer's (2007). Infectious diseases of the respiratory system. In: M.G. Maxie, *Pathology of Domestic Animals* (5ª ed., pp.523-653). Philadelphia: Elsevier Saunders.

Jones, T.C., Hunt, R.D. & King, N.W. (1997). Diseases Caused by Bacteria. In: T.C. Jones, R.D. Hunt & N.W. King, *Veterinary Pathology* (6ª ed., pp. 413-503). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

Lilenbaum, W. (2000). Atualização em tuberculose bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 22, 145-151.

Laidlaw, M. (1978). *Mycobacterium: Bacilos da Tuberculose*. In: J.G. Collee, J.P. Duguid, A.G. Fraser & B.P. Marmion, *Microbiologia Médica* (6ª ed., pp. 593-618). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Kriz, P., Kralik, P., Slany, M., Slana, I., Svobodova, J., Parmova, I., Barnet, V., *et al.* (2011). *Mycobacterium pinnipedii* in captive Southern sea lion (*Otaria flavescens*): a case report. *Veterinarni Medicina*, 56, 307-313.

Kubica, T., Rusch-Gerdes, S. & Niemann, S. (2003). *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* Caused One-Third of Human *M. bovis* Associated Tuberculosis Cases Reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3070-3077.

Melo, L.E.H., Mota, R.A., Maia, F.C.L., Fernandes, A.C.C., Silva, T.I.B., Leite, J.E.B., *et al.* (2012). Ocorrência e caracterização da tuberculose em caprinos leiteiros criados no estado de Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras*, 32, 831-837.

McGavin, M.D. & Zachary, J.F. (2007). Diseases of Immunity. In: M.D. McGavin & J.F. Zachary, *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (4^a ed., pp. 193-253). Missouri: Mosby.

Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F. & Quinn, P.J. (1994). The tuberculin test. *Vet. Microbiol*, 40, 111-124.

Niemann, S., Richter, E. & Rusch-Gerdes, S. (2002). Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 52, 433-466.

Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B. & Hanna, J. (1994). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol*, 40, 41-52.

Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (2009). *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012: Bovine Tuberculosis*. OIE.

Pérez de Val, B., Nofrarias, M., López-Soria, S., Garrido, J.M., Vordermeier, H.M., Villarreal-Ramos, B., Martín, M., *et al.* (2012). Effects of Vaccination Against Paratuberculosis on Tuberculosis in goats: Diagnostic Interferences and Cross-protection. *BMC Veterinary Research*, 8, 191.

Pérez de Val, B., López-Soria, S., Nofrarias, M., Martín, M., Vordermeier, H.M., Villarreal-Ramos, B., Romera, N., *et al.* (2011). Experimental Model of Tuberculosis in the Domestic Goat after Endobronchial Infection with *Mycobacterium caprae*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18, 1872-1881.

Pfyffer, G.E. (2007). *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry & M.A. Pfaller, *Manual of Clinical Microbiology* (9^a ed., pp.543-564). Washington: ASM Press.

Prodinger, W.M., Brandstatter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschioli, M.L., Aranaz, A., *et al.* (2005). Characterization of *Mycobacterium caprae* Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 10, 4984-4992.

Quintas, H.M.P. (2009). *Estudo de um foco de tuberculose em caprinos de Trás-os-Montes*. Dissertação apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, Vila Real, Portugal.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. & Leonard, F.C. (2002). *Mycobacterium* species. In: P.J. Quinn, B.K. Markey, M.E. Carter, W.J. Donnelly & F.C. Leonard, *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (First published, pp. 97-105). Oxford: Blackwell Publishing.

Rodríguez, S., Bezos, J., Romero, B., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N. *et al.* (2011). *Mycobacterium caprae* Infection in Livestock and Wildlife, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 17,

Richter, E., Weizenegger, M., Rusch-Gerdes, S. & Niemann, S. (2003). Evaluation of Genotype MTBC Assay for Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 2672-2675.

Radostits, O.M, Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. (2002). Doenças causadas por bactérias. In: O.M. Radostits, C.C. Gay, D.C. Blood & K.W. Hinchcliff, *Clínica Veterinária* (9ª ed., pp. 817-849). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Rastogi, N., Legrand & Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.*, 20, 21-54.

Runyon, E.H., Wayne, L.G. & Kubica, G.P. (1974). Family II. Mycobacteriaceae. In: R.E. Buchanan, N.E. Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, *et al.*, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Eighth Edition, pp. 681-701). Baltimore: Williams & Wilkins Company.

Sanchez, J., Tomás, L., Ortega, N., Buendía, A. J., del Rio, L., Salinas, J., Bezos, J., et al. (2011). Microscopical and Immunological Features of Tuberculoid Granulomata and Cavitory Pulmonary Tuberculosis in Naturally Infected Goats. *J. Comp. Path.*, 145, 107-117.

Stevens, A. & Lowe, J. (2000). Tissue response to damage. In: A. Stevens & J. Lowe, *Pathology* (2ª ed., pp. 35-61). Philadelphia: Mosby.

Smith, B.P. (1996). Disorders of the Organ Systems. In: B.P. Smith, *Large Animal Internal Medicine* (2ª ed., pp. 550-679). St. Louis: Mosby.

Tizard, I.R. (2004). Type IV Hypersensitivity: Delayed Hypersensitivity. In: I.A. Tizard, *Veterinary Immunology* (7ª ed., pp. 343-351). Philadelphia: Saunders.

Vergara, G.M. & Delgado, A.C. (2011). Prevalencia de Tuberculosis Caprina en la Provincia de Barranca. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 22, 268-273.

Vicente, P. (2004). Aspectos zoonóticos de la epidemiología de la tuberculosis en Espana. *SSAZ-DGSP-CS*, Região de Murcia, 7-39.

World Health Organization (WHO) (2011). Global tuberculosis Control: WHO report 2011. WHO, Geneva, Suíça.